

SESIÓN CIENTÍFICA CELEBRADA EL 26 DE NOVIEMBRE DE 2020 PARA CONMEMORAR LOS PREMIOS NOBEL EN FISIOLÓGÍA O MEDICINA Y EN QUÍMICA 2020

SCIENTIFIC SESSION HELD ON NOVEMBER 26, 2020 TO COMMEMORATE THE NOBEL AWARDS IN PHYSIOLOGY OR MEDICINE AND IN CHEMISTRY 2020

Juan-Ramón Lacadena¹, Pablo Gastaminza Landart², Lluís Montoliu³

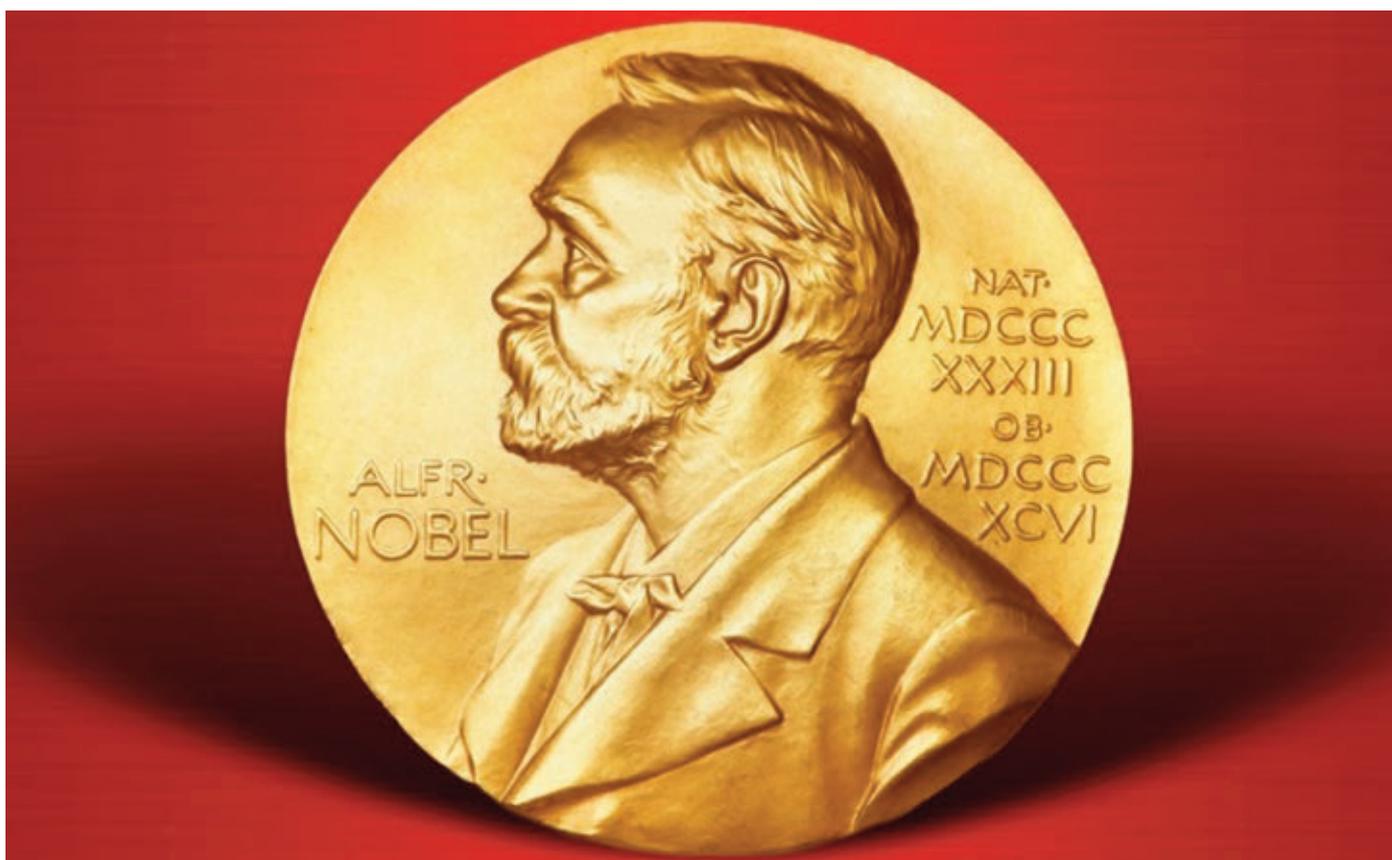
¹Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia.

²Centro Nacional de Biotecnología. Agencia Estatal Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

³Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC) y Centro de Investigación Biomédica en Red en Enfermedades Raras (CIBERER-ISCIII)

*corresponding author: jrlgbucm@bio.ucm.es

REVISIÓN





EL PREMIO NOBEL EN FISIOLÓGÍA O MEDICINA 2020

Juan-Ramón Lacadena

Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia.

EL PLANETA DE LOS VIRUS: EL VIRUS VHC RESPONSABLE DE LA HEPATITIS C

Parfraseando el título de una famosa película protagonizada por Charlton Heston ("El planeta de los simios"), hago más las palabras del periodista Juan Ochoa de Eribe que decía, a raíz de la pandemia del coronavirus, que habitamos en el "planeta de los virus" (*El Mundo*, 8 abril 2020, p.18). Se calcula que existen más de 100 millones de tipos diferentes de virus, infectando a 1.750.000 especies distintas, jugando un papel importante en nuestro ecosistema. La inmensa mayoría son inocuos para la humanidad. Hasta 2012 solamente se habían identificado 219 tipos (¿especies?) de virus capaces de infectar al ser humano, descubriéndose 3 ó 4 nuevos tipos cada año. Al menos dos tercios serían capaces de infectar también otros huéspedes no humanos, principalmente mamíferos y en ocasiones aves. Unos 110 tipos de virus son capaces de transmitirse entre personas y solamente 55 tienen capacidad epidémica. Se estima que en los océanos existen 1031 partículas virales (1)

Se ha planteado muchas veces la cuestión de si los virus son organismos vivos o no; para mí sí lo son aunque sean poco más que ácido nucleico (ADN o ARN) y proteínas. No tienen todos los ingredientes que utilizan las células para vivir, pero los utilizan en su propio beneficio (multiplicarse). El virión es la partícula viral inerte cuando está fuera de la célula. Los virus no pueden vivir fuera de una célula.

Aunque parezca algo apocalíptico, las citas que hago a continuación sobre el *ADN egoísta* tienen que hacernos reflexionar. ¿Qué sentido biológico tiene una pandemia como, por ejemplo, la del SARS CoV-2 que estamos padeciendo en la actualidad? ¿Y desde el punto de vista evolutivo?

- "Los virus son malas noticias envueltas en proteínas", decía Peter Medawar, Premio Nobel en Fisiología o Medicina 1960. Las malas noticias pueden venir escritas en dos alfabetos distintos, según que su genoma sea de ADN o de ARN. Son como "caramelos envenenados", me atrevería a decir yo.
- "El ADN ni se preocupa ni conoce. El ADN nada más es. Y nosotros danzamos al son de su música, decía Richard Dawkins ("*El gen egoísta*").
- "El ADN proporciona la música; nuestras células y el ambiente proporcionan la orquesta" (J. Craig Venter).

Según la Organización Mundial de la Salud (consulta web 5/10/2020),

- el virus de la hepatitis C (VHC) se transmite a través de la sangre: la mayoría de las infecciones se producen por exposición a pequeñas cantidades de sangre. Ello puede ocurrir por consumo de drogas inyectables, prácticas de inyección o de atención sanitaria poco seguras, transfusión de sangre y productos sanguíneos sin analizar, y prácticas sexuales que conllevan contacto con sangre,
- 71 millones de personas con infección crónica de VHC, muchas de las cuales sufrirán cirrosis o cáncer de hígado (hepatocarcinoma),
- en 2016 murieron 399.000 personas,
- los antiviricos pueden curar más del 95% de los casos, pero el acceso al diagnóstico y tratamiento es limitado (desequilibrio mundial),
- no hay todavía vacunas contra la hepatitis C.

Clasificación de los virus

Hay varias formas de clasificar los virus. Desde el punto de vista sistemático, el virus de la hepatitis C pertenece al género *Hepavivirus*, familia *Flaviviridae*, filo *Kitrinoviricota*, pero desde una perspectiva genética me parece más adecuado hacer una clasificación en función de su organización genética: material hereditario o genoma (ADN o ARN), tipo de molécula (circular o lineal), tipo de hélice (sencilla o doble) y, finalmente, tipo de huésped al que parasita (bacteria, animal o vegetal), tal como propuso David Baltimore, Premio Nobel en Fisiología o Medicina 1975 "por sus descubrimientos en relación con la interacción entre los virus tumorales y el material genético de la célula". Al final, lo que interesa es cómo se llega al ARN mensajero (ARNm) en la célula para producir la síntesis de las proteínas virales que permitan la reproducción del virus.

El virus de la hepatitis C (VHC), que tiene una cápside icosaédrica, es un virus de ARN monocatenario (mc) de 9,6 Kb perteneciente al grupo IV, según la clasificación de Baltimore: ARNm(+) → ARNm(-) → ARNmensajero → proteínas reguladoras y estructurales → progenie del virus. Por la situación pandémica actual, podemos recordar que también pertenecen al grupo IV los coronavirus. El 5 de octubre de 2020, la Asamblea Nobel del Instituto Karolinska de Estocolmo comunicaba que el Premio Nobel en Fisiología o Medicina 2020 había sido concedido a los doctores Harvey J. Alter, Michael Houghton y Charles M. Rice "por el descubrimiento del virus de la hepatitis C".

Como señala la propia Institución Nobel,

- En la década de los setenta del siglo pasado (1972, 1975, 1978), el Dr. Alter demostró que la hepatitis asociada con las transfusiones de sangre era producida por un virus desconocido "noA, noB" (2, 3, 4, 5)
- Al final de la década de los ochenta, en 1989, el Dr.



Houghton (6, 7) aisló el genoma del virus que denominó "hepatitis C virus" (VHC).

- Finalmente, en 1997, el Dr. Rice proporcionó la evidencia final de que el virus por sí solo podía causar la hepatitis. Para ello generó un ARN variante del VHC que, al inyectarla en el hígado de chimpancés, originaba la presencia de partículas virales en la sangre y producía patologías semejantes a las humanas. Era la prueba definitiva de que el virus justificaba los casos no explicados de hepatitis producidas por la transfusión de sangre (8).

Aquí podemos señalar también que, en 1976, el Dr. Baruch Blumberg había recibido el Premio Nobel en Fisiología o Medicina por su descubrimiento del virus de la hepatitis B, transmisible por la sangre.

REFERENCIAS

1. Venter JC. Proyecto Genoma Océano, "A life decoded. My genome: my life"; 2007 pág. 344).
2. Alter HJ, Holland PV, Purcell RH, Lander JJ, Feinstone SM, Morrow AG, Schmidt PJ. Posttransfusion hepatitis after exclusion of commercial and hepatitis-B antigen-positive donors. *Ann Intern Med* 1972; 77:691-9.
3. Feinstone SM, Kapikian AZ, Purcell RH, Alter HJ, Holland PV. Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B. *N Engl J Med* 1975; 292: 767-770.
4. Alter HJ, Holland PV, Morrow AG, Purcell RH, Feinstone SM, Moritsugu Y. Clinical and serological analysis of transfusion-associated hepatitis. *Lancet* 1975; 2: 838-841.
5. Alter HJ, Purcell RH, Holland PV, Popper H. Transmissible agent in non-A, non-B hepatitis. *Lancet* 1989; 1: 459-463.
6. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989; 244: 359-362.
7. Kuo G, Choo Q.L, Alter HJ, ... Houghton, M. An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science* 1989; 244: 362-4.
8. Kolykhalov AA, Agapov EV, Blight KJ, Mihalik K, Feinstone SM, Rice CM. Transmission of hepatitis C by intrahepatic inoculation with transcribed RNA. *Science* 1997; 277:570-4.



DE LA HEPATITIS NO-A, NO-B HACIA LA ELIMINACIÓN DEL VIRUS DE LA HEPATITIS C

FROM THE DISCOVERY OF NON-A, NON-B HEPATITIS VIRUS TOWARDS HEPATITIS C VIRUS ELIMINATION

Pablo Gastaminza Landart

Centro Nacional de Biotecnología. Agencia Estatal Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

RESUMEN

El 5 de octubre de 2020, la Asamblea Nobel y el Comité Nobel de Fisiología o Medicina, anunciaron que tres científicos, los Dres. Harvey Alter, Michael Houghton y Charles Rice serían los galardonados con el premio Nobel de Medicina 2020 "por el descubrimiento del virus de la hepatitis C". El virus de la hepatitis C (HCV) es uno de varios virus capaces de causar inflamación crónica del hígado y patologías potencialmente mortales como la cirrosis y carcinoma hepatocelular. Las observaciones del Dr. Harvey Alter en el Centro Clínico de los NIH provocaron el postulado de un virus que era diferente de los virus de la hepatitis A y la hepatitis B conocidos en ese momento. Después de muchos años de frustración tratando de identificar el agente infeccioso responsable del virus asociado a la transfusión no A, no B, utilizando técnicas virológicas convencionales, el Dr. Michael Houghton logró, no solo identificar inequívocamente HCV, sino también generar reactivos esenciales para prevenir la propagación del virus a través de transfusión de lotes de sangre contaminados. Estas herramientas y las herramientas moleculares posteriores que se desarrollaron tras este descubrimiento sugieren que más de 70 millones de personas están actualmente infectadas con HCV en todo el mundo. Tras muchos años de intentos frustrados de aislar y propagar el virus en modelos de cultivo celular para estudiar la virología básica del HCV, el Dr. Charles Rice fue pionero en muchos estudios con el objetivo de caracterizar funciones básicas de las proteínas virales para las que desarrolló, entre otros, sistemas de genética inversa y ensayos funcionales en forma de replicones, una herramienta biológica que fue fundamental para desarrollar las terapias antivirales actuales. Sin embargo, sus experimentos pioneros de genética inversa en el modelo del chimpancé, mediante los cuales rescató viriones infecciosos a partir de material genético viral clonado, aseguraron su presencia entre los premiados. En esta breve revisión, analizamos el contexto en el que se realizaron estas contribuciones fundamentales y cómo se ha impulsado la investigación en el campo hasta el punto en que la OMS sugiere la erradicación del virus utilizando las terapias disponibles actualmente.

ABSTRACT

In October 5 2020, the Nobel Assembly and the Nobel Committee for Physiology or Medicine, announced that three scientists Drs. Harvey Alter, Michael Houghton and Charles Rice were awarded with the Nobel prize in Medicine 2020 "for the discovery of the hepatitis C virus". Hepatitis C virus (HCV) is one of several viruses capable of causing chronic liver inflammation and life-threatening pathologies like cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Dr. Harvey Alter observations at the NIH Clinical Center prompted the postulate of a virus that was different from the hepatitis A and hepatitis B viruses known at that time. After many years of frustration trying to identify the infectious agent responsible for the non-A, non-B, transfusion-associated virus using conventional virological techniques, Dr. Michael Houghton succeeded not only at unequivocally identifying HCV, but also at generating essential reagents to prevent the spread of the virus through contaminated blood banks. These tools and subsequent molecular tools developed after this discovery suggest that more than 70 million people are currently infected with HCV worldwide. These studies were followed again by many years of frustrated attempts at isolating and propagating the virus in cell culture models to study basic virology on HCV. Dr. Charles Rice pioneered many studies aiming at characterizing basic functions of the viral proteins for which he developed among others, reverse genetics systems and functional assays in the form of replicons, a biological tool that was instrumental to develop the current antiviral therapies. However, its pioneer reverse genetics experiments in the chimpanzee model, by which he rescued infectious virions from cloned viral genetic material, granted his presence among the awardees. In this brief review, we discuss the context in which these seminal contributions were made and how HCV research has been propelled to the point where WHO is suggesting virus eradication using the currently available therapies.

Palabras Clave:

hepatitis C
transfusión
hepatitis viral
genética inversa
replicones
antivirales de acción directa

Keywords:

hepatitis C
transfusion
viral hepatitis,
reverse genetics
replicons
direct-acting antivirals

1. INTRODUCCIÓN

El pasado 5 de octubre de 2020, la Comisión de los Premios Nobel del Instituto Karolinska anunció la concesión del Premio Nobel de Medicina y Fisiología a tres investigadores: el Dr. Harvey Alter, el Dr. Michael Houghton y el Dr. Charles Rice, por las investigaciones que llevaron al descubrimiento del virus de la hepatitis C, el agente etiológico causante de más de 70 millones de infecciones crónicas y de más del 25% de los casos de cirrosis y cáncer de hígado en el mundo. En este artículo se presenta el contexto en el que se llevaron a cabo dichas investigaciones y se explicita cómo sus contribuciones no se circunscriben al mero descubrimiento de este virus, sino también al desarrollo de métodos diagnósticos y terapéuticos que hacen de la eliminación de la pandemia por el virus de la hepatitis C un objetivo viable para las próximas décadas según los planes de la Organización Mundial de la Salud.

2. LAS HEPATITIS VÍRICAS CONSTITUYEN UN IMPORTANTE PROBLEMA BIOMÉDICO A NIVEL MUNDIAL

^oLas hepatitis víricas están causadas por un grupo diverso de virus con genomas y estrategias de replicación muy diferentes que convergen en su capacidad para generar daño e inflamación del hígado por su tropismo hepático. Las hepatitis víricas causan más de 1,25 millones de muertes al año, una cifra comparable a las muertes causadas por tuberculosis y superiores a las causadas por el VIH (WHO, 2017). Sin embargo, mientras que la mortalidad causada por la tuberculosis y el VIH sigue disminuyendo el número de muertes por hepatitis víricas sigue aumentando y se prevé que siga aumentando en los próximos años (1). Este aumento se debe

principalmente a la alta incidencia de patologías derivadas de infecciones crónicas en pacientes portadores del virus de la hepatitis B (*Hepadnaviridae*) y de la hepatitis C (*Flaviviridae*). Dichas complicaciones derivan de una inflamación crónica del hígado (hepatitis) y fibrosis que puede llevar a alteraciones irreversibles de la función hepática como la cirrosis. La cirrosis a su vez está asociada con el desarrollo de carcinoma hepatocelular, una enfermedad con limitadas opciones terapéuticas que, junto con la cirrosis causó la muerte de más 1 millón de personas sólo en 2016 (1). Las hepatitis víricas crónicas constituyen el agente etiológico de alrededor del 50% de los casos totales de cirrosis y cáncer de hígado, por delante del consumo crónico de alcohol (1). Las patologías asociadas con las infecciones por virus de la hepatitis B o C derivan principalmente de una respuesta inmunológica activa, capaz de eliminar hepatocitos infectados, pero incapaz de erradicar la infección crónica del individuo, si bien los determinantes por los que la respuesta inmunológica del hospedador es ineficaz en el caso de la hepatitis B o en el caso de la hepatitis C son diferentes (2), (3).

Además de las infecciones crónicas, existen infecciones víricas que cursan en forma de hepatitis aguda. El virus de la hepatitis B, que causa graves patologías cuando establece infecciones crónicas, es además la primera causa de muerte por hepatitis vírica aguda, siendo responsable del 75% de las muertes por esta causa. El resto de muertes son asignables en su mayoría a la infección aguda por el virus de la hepatitis E (*Hepeviridae*) que constituye el 19% de las infecciones de hepatitis aguda y el virus de la hepatitis A (*Picornaviridae*) que constituye el 4%. El virus de la hepatitis C sólo causa la muerte por infección aguda excepcionalmente y supone el 2% de los casos restantes (1).

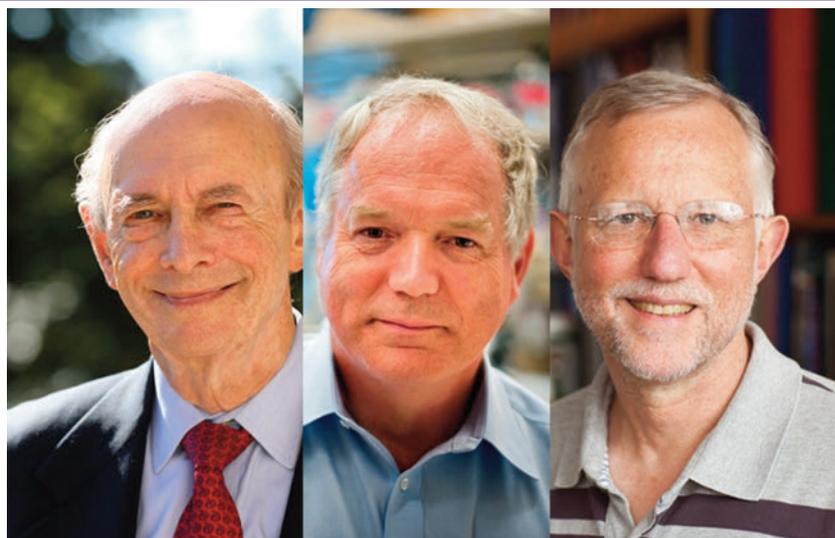


Figura 1: Fotografía de los tres investigadores premiados con el Nobel de Medicina y Fisiología 2020. De izqda. a dcha: Harvey Alter (NIH; EEUU); Michael Houghton (U. Alberta; CAN); Charles Rice (U. Rockefeller; EEUU). Fuente: Karolinska Institutet webpage.



3. BREVE PERSPECTIVA HISTÓRICA SOBRE LAS HEPATITIS INFECCIOSAS

Uno de los signos clínicos más evidentes de la hepatitis es la ictericia, que se manifiesta como consecuencia de la acumulación de bilirrubina en piel y mucosas y es especialmente evidente en la coloración amarillenta del blanco del ojo o esclerótica. El nombre ictericia se recoge en escritos de Plinio el viejo (29-71 A.C.), donde describe que la ictericia podría curarse observando un pájaro de color amarillo (Icteros). Si bien el nombre del signo clínico deriva de Icteros, existen referencias a la ictericia ya en escritos babilonios y chinos allá por el 3400 A.C. Por lo tanto, la ictericia y, probablemente las hepatitis víricas han acompañado al ser humano desde hace mucho tiempo. La primera referencia documentada del potencial infeccioso de la ictericia se infiere de las recomendaciones que el papa Zacarías hizo por carta a San Bonifacio en el año 751. Entre dichas recomendaciones se indicaba no suministrar la Comunión a personas con ictericia u otras dolencias y dejarlos para el final, una vez otras personas hubieran comulgado [revisado en (4)].

A lo largo de los años, el término ictericia epidémica o ictericia de campaña, dada la gran incidencia de este mal entre tropas enviadas a diversas campañas, fue sustituido por el término hepatitis infecciosa, gracias a los estudios realizados en el siglo XVIII, donde se observó que la ictericia coincidía con la "atrofia hepática". A lo largo de los siglos, el término hepatitis infecciosa se fue asentando para describir este mal asociado a brotes esporádicos atribuible en algunos casos a situaciones de insalubridad, sobre todo a fuentes de agua contaminada [revisado en (4)].

A medida que la ciencia médica fue avanzando y que fueron existiendo tratamientos o intervenciones médicas que implicaban la inyección de sustancias o fluidos en personas, comenzaron a aparecer referencias a otro tipo de hepatitis, no atribuibles a las causas anteriormente mencionadas, ni con una epidemiología en forma de brotes esporádicos. Así, el Dr. Lurmen (Brehme, 1885) acuñó el término "hepatitis del suero" tras observar una enorme incidencia de casos de hepatitis en una cohorte de personas inoculadas con linfa de un paciente infectado por Vaccinia, como método de vacunación frente a la viruela, señalando que se sospechaba de dicho paciente como fuente infecciosa de la hepatitis transmitida [revisado en (4)]. Unos años más tarde, el Dr. Stokes (USA, 1920) informaba de una incidencia mayor de lo normal de hepatitis del suero en la Clínica Mayo en una unidad donde se trataba a pacientes aquejados de sífilis con inyecciones de arsenamina (5). Por lo tanto, la idea de que además de una hepatitis infecciosa, existía un segundo tipo de hepatitis, la hepatitis del suero, se fue consolidando.

Durante la segunda guerra mundial, tanto los desplazamientos de tropas a diversas zonas del planeta endémicas para la hepatitis infecciosa, así como la creciente utilización de vacunas, tratamientos inyectables y transfusiones, los casos de hepatitis causaron serios estragos entre las tropas de ambos bandos, promoviendo una intensa investigación experimental en seres humanos en la década de los años cuarenta. Estas investigaciones realizadas en seres humanos, de dudosa calidad ética según los criterios actuales, no hicieron sino confirmar la existencia de agentes infecciosos que provocan hepatitis aguda y autolimitada, pero también agentes infecciosos que provocan un tipo de hepatitis con curso más prolongado y que parecía no ser eliminado con facilidad. [revisado en (4)].

Harvey Alter, un estudioso de la transmisión de la hepatitis por transfusión sanguínea

Una forma común de adquisición de la hepatitis del suero era la transfusión de sangre. En este sentido, el Dr. Harvey Alter, del Clinical Research Center del NIH, estaba implicado en la investigación del origen y agente etiológico responsable del elevado número de casos de hepatitis transmitidas por transfusión. En la década de los 60 ya se acuñaba el término hepatitis A para la hepatitis infecciosa y hepatitis B para la hepatitis del suero. Con el descubrimiento accidental de un antígeno presente en el suero de un individuo aborigen de Australia que reaccionaba con pacientes hemofílicos transfundidos en diversos lugares del mundo por parte del Dr. Alter y el Dr. Blumberg, el denominado antígeno Australiano (6), se sentaron las bases para la identificación de un agente infeccioso transmisible por la sangre, capaz de transmitir la hepatitis del suero. Este hallazgo, por parte del Dr. Blumberg y sus numerosos colaboradores, resultó en el descubrimiento del agente etiológico de la hepatitis B y de un test antigénico capaz de identificar dicho agente en los donantes de sangre (6). Este descubrimiento, por el que el Dr. Blumberg recibió el premio Nobel 1976, permitió estudiar a fondo la hepatitis del suero, transmitida por el virus de la hepatitis B. En este sentido, el Dr. Harvey Alter implementó diversas medidas preventivas para evitar la transmisión de la hepatitis en su centro de transfusiones. Además de emplear test sustitutos, como la medida de las transaminasas en el plasma de los donantes, implementó los test antigénicos, basados en los hallazgos conjuntos con el Dr. Blumberg para cribar pacientes potencialmente infectados. Esta metodología permitió reducir la tasa de transmisión de hepatitis, pero no eliminarla completamente, siendo la tasa de transmisión aún demasiado elevada para el Dr. Alter (7).



Unos años después, en 1973, el equipo del Dr. Purcell del NIH, pudo identificar la existencia del virus de la hepatitis A, mediante la técnica de inmunomicroscopía electrónica (8), una técnica que también sería empleada para el diagnóstico de pacientes infectados y que el Dr. Alter empleó para el cribado de sus bancos de sangre. La disponibilidad de test serológicos para la detección de la hepatitis infecciosa (virus de la hepatitis A) y de la hepatitis del suero (virus de la hepatitis B) parecía poner fin a las preocupaciones del Dr. Alter, que por fin podría cribar los lotes de sangre para prevenir la transmisión de la hepatitis. No obstante, en 1975, el Dr. Alter publicó la transmisión de, todavía, numerosos casos de hepatitis de sangre de donantes negativos frente a antígenos de HAV o HBV (9). En este trabajo, por lo tanto, se infiere la existencia de un agente infeccioso no-A, no-B capaz de transmitir la hepatitis por transfusión, una noción que quedó demostrada en un estudio posterior mediante inoculación experimental de chimpancés con suero de pacientes con hepatitis no-A, no-B, que desarrollaron la enfermedad y establecieron el primer modelo experimental para este nuevo agente infeccioso. Las observaciones clínicas del Dr. Alter y otros, llevaron a identificar al virus no-A, no-B como un agente infeccioso responsable del desarrollo de hepatitis crónica y de su evolución hacia cirrosis (10).

Tras este éxito, siguieron años de frustración por la incapacidad de aislar el agente infeccioso mediante su propagación en cultivos celulares, algo que sin duda, retrasó la caracterización de lo que luego vendría a denominarse como el virus de la hepatitis C (11). En estos años, el único modelo de infección experimental continuó siendo el del chimpancé, lo que llevó a tener que emplear dichos animales para establecer parámetros tan básicos como el diámetro aproximado (60 nm) (12) o la presencia de una envuelta lipídica de la partícula infecciosa (13).

Michael Houghton: Técnicas moleculares para identificar el agente causante de la hepatitis no-A, no-B

La imposibilidad de aislar el virus causante de la hepatitis no-A, no-B llevó a los investigadores a tomar estrategias alternativas a las de la virología clásica para identificar inequívocamente el agente infeccioso. Una de estas estrategias fue la tomada por el equipo del Dr. Michael Houghton en la empresa Chiron (California, EEUU). El Dr. Houghton era experto en clonaje molecular y expresión de genes en sistemas recombinantes, como así atestiguan su trabajo sobre el gen del interferón beta humano, que clonó y expresó de manera recombinante en bacterias (14). El Dr. Houghton estaba implicado en el clonaje y caracterización de los ácidos nucleicos del virus de la hepatitis no-A, no-B. Para ello tomaron diversos abor-

dajes experimentales, como la hibridación con sondas de virus de géneros a los que se sospechaba que pertenecía no-A, no-B como *Flaviviridae* o *Togaviridae*, sin éxito. Su experiencia en la expresión de proteínas recombinantes en bacteria y los trabajos de Shimizu y cols. en los que pudieron demostrar inmunoreactividad en especímenes histológicos de chimpancés infectados con no-A no-B (15), inspiraron la estrategia del equipo del Dr. Houghton para identificar el agente causante de la hepatitis. Esta metodología consistió en la generación de librería de ácidos nucleicos, tanto RNA como DNA, presentes en material ultracentrifugado a partir de plasma de chimpancés infectados con el virus no-A no-B. Estas colecciones de secuencias se clonaron en un fago recombinante ϕ gt11, vector capaz de inducir la expresión de los cDNA presentes en la colección en bacterias. La expresión de antígenos no-A, no-B sería posteriormente detectada mediante anticuerpos de pacientes convalecientes. Este proceso de cribado de miles de secuencias presentes en material infeccioso obtenido de chimpancés produjo numerosos resultados negativos, pero llevó a la identificación de un único clon molecular capaz de expresar antígenos susceptibles de ser reconocidos por los sueros (16). En este sentido, la utilización de un suero de un paciente con una hepatitis particularmente severa pareció ser la clave para la identificación del clon 5-1-1, que codifica el antígeno C100-3 (16).

La secuenciación de dicho clon, así como la de otros clones portadores de la secuencia, permitieron ensamblar un genoma viral de cadena sencilla y polaridad positiva de unas 9,600 nucleótidos de longitud, con un único marco de lectura abierta flanqueado por dos regiones aparentemente no traducidas (16). Este genoma relacionaba filogenéticamente a este agente con la familia *Flaviviridae*, que pasó a fundar un nuevo género de los Hepacivirus, bajo el nombre de virus de la hepatitis C (16).

El descubrimiento de una secuencia codificante de antígenos del agente responsable de la mayor parte de las hepatitis crónicas se presentó como una oportunidad para el Dr. Houghton para poder expresar dichos antígenos de forma recombinante con el objetivo de implementar el diagnóstico serológico de pacientes infectados por el virus de la hepatitis C (17). Esta metodología, publicada por el propio Houghton en colaboración con Dr. Alter, fue empleada para demostrar de manera retrospectiva y prospectiva que muchos pacientes de la hepatitis no-A, no-B eran portadores de anticuerpos que reconocían antígenos del recién descubierto virus de la hepatitis C (17,18). En años posteriores, la implementación de tests basados en antígenos inmunodominantes permitieron una notable reducción de los casos de hepatitis adquirida mediante transfusión (19,20), algo que se reflejó claramente en el número de casos de hepatitis aguda en EEUU. Estos logros en los que los Drs. Alter y Houghton estuvieron implicados, más allá de confirmar la existencia de un nuevo virus capaz de transmitir hepatitis crónica, permitieron un control parcial de su propagación mediante la implementación de tests serológicos de diagnóstico y cribado de los bancos de sangre (19,20).



Charles Rice: virología molecular para la generación de herramientas de estudio del virus

La identificación de este nuevo virus de gran relevancia biomédica atrajo sin duda la atención de numerosos investigadores que deseaban profundizar en las funciones de los diferentes elementos de RNA viral y de sus proteínas. Sin embargo, virólogos de todo el mundo se toparon con el hecho de que este virus no era susceptible de propagación en cultivos, dificultando así el estudio de sus funciones. No obstante, estudios basados en la sobreexpresión de proteínas virales permitieron comenzar a entender algunos de los aspectos fundamentales de la infección por HCV. Entre otros, el Dr. Charles Rice, en la Universidad de Washington (St. Louis, Missouri), un virólogo experto en el estudio de Flavivirus (familia *Flaviviridae*) como el virus de la fiebre amarilla, fue capaz de delinear el mapa de expresión de proteínas del virus descubierto recientemente por M. Houghton y para el que no existían modelos de infección, empleando para ello sistemas de expresión basados en virus Vaccinia o virus Sindbis recombinantes y sueros de pacientes convalecientes (21-25). Estos trabajos permitieron, entre otros, la identificación de dos proteasas virales NS3/4A y NS2, pero no permitían el estudio de elementos del genoma que no estuvieran directamente relacionados con el procesamiento de la poliproteína viral. Para dichos estudios de genética inversa, es decir, estudios donde se estudia el impacto de una mutación introducida experimentalmente en un gen en un determinado fenotipo, Rice disponía de la secuencia, más o menos completa del agente infeccioso, pero carecía de células susceptibles para el rescate de virus infeccioso, ya que el único modelo de infección experimental disponible era el chimpancé. Por ello, el grupo del Dr. Rice se puso manos a la obra para poder clonar la secuencia completa de virus presentes en el suero de chimpancés portadores de la infección crónica y para ello construyeron una serie de clones moleculares, para los que no tuvieron otra alternativa que inocular intrahepáticamente en el hígado de chimpancés no infectados. Así fue como, en 1997, el grupo de Rice y colaboradores publicó el rescate (producción de virus infeccioso a partir de DNA recombinante) de virus del hepatitis C infeccioso a partir de clones moleculares inoculados en forma de ARN transcrito in vitro en el hígado de chimpancés (26). Estos estudios llevaron a la propagación de virus infeccioso y a la transmisión de la patología (hepatitis) a los animales inoculados logrando por primera vez la demostración experimental de los requerimientos estructurales del genoma del virus de la hepatitis C necesarios para iniciar la infección (26). Estudios muy similares fueron llevados a cabo por el grupo del Dr. Jens Bukh (NIH), donde realizó experimentos análogos (27). Posteriormente el equipo del Dr. Bukh fue pionero en los estudios de genética inversa, al introducir mutaciones y deleciones deseadas en

dichos clones moleculares infecciosos, demostrando la relevancia funcional de la proteína p7 del virus de la hepatitis C (28).

Parecía evidente que la utilización de chimpancés para estudios de aspectos fundamentales de la biología de la infección por HCV no permitiría avanzar de una manera razonable y eficaz. Los fracasos a la hora de buscar líneas celulares que permitiesen la replicación de RNAs virales funcionales generados por diferentes grupos se contaban por decenas, ya que ningún grupo de investigación fue capaz de obtener y propagar virus infeccioso a partir de los clones moleculares que sí funcionaban en chimpancés. Esto llevó a grupos como los del Dr. Rice o del Dr. Bartenschlager (Universidad de Heidelberg) a tratar de recapitular aspectos parciales de la infección mediante la eliminación de elementos de RNA que pudieran ser prescindibles para la replicación del RNA viral, como la región correspondiente a las proteínas estructurales, presentes en el virión y la introducción de elementos de RNA que permitieran la selección de genomas y líneas celulares capaces de replicar eficazmente mediante aplicación de una presión selectiva en forma de antibiótico. Así, nacieron los replicones de HCV, elementos autorreplicativos de ARN di-cistrónicos basados en genomas delecionados y en la introducción de un gen de resistencia a neomicina y de un segundo cistrón bajo el control traduccional del IRES del virus de la encefalomiocarditis. Estos ARN subgenómicos y las líneas celulares portadoras resultantes constituyeron una auténtica revolución en el campo porque permitían por primera vez disponer de un modelo de cultivo celular para el estudio del virus de la hepatitis C y de la identificación y/o selección de líneas celulares hipersusceptibles (29). Estos trabajos de los equipos alemán y americano fueron publicados en el año 1999 y 2000 respectivamente, cambiando para siempre el estudio del virus de la hepatitis C (30) (31).

Una enorme producción científica basada en éstos y otros replicones similares hicieron avanzar el conocimiento de los aspectos más fundamentales de los determinantes genéticos del genoma del virus, al menos en sus aspectos de replicación de ARN viral y de sus interacciones con el hospedador. Sin embargo, a pesar de la identificación de líneas celulares que sostenían la replicación del RNA viral y la expresión de una replicasa funcional, la propagación de virus infeccioso en cultivo se resistía, con algunas excepciones en cultivos de hepatocitos primarios humanos.

Esta situación cambió con la identificación de una cepa muy particular del virus, la cepa JFH-1 (Japanese Fulminant Hepatitis 1) construida a partir de la secuencia consenso de los virus circulantes en un paciente japonés con hepatitis fulminante. La primera pista de que éste sería una cepa particular vino del hecho que la tasa de replicación del replicón subgenómico JFH-1 era excepcionalmente alta y de que los replicones podían establecerse incluso en líneas celulares no hepáticas, aunque con baja eficiencia



(32). Esto llevó al Dr. Wakita del Metropolitan Institute de Tokio y responsable de la caracterización inicial de los replicones a colaborar con diferentes equipos en el mundo para tratar de producir virus infeccioso gracias a un clon molecular completo de JFH-1. Se tomaron diversas estrategias, tanto la transfección de genomas completos de JFH-1 como de quimeras de la replicasa de JFH-1 con regiones estructurales de otros genotipos (33,34). En el caso del equipo del galardonado Dr. Rice, se empleó una quimera con otro virus del mismo genotipo, logrando el rescate de virus infeccioso tanto en cultivo celular como en modelos de infección con chimpancés (35,36). Otros grupos publicaron simultáneamente este hallazgo, que permitió por primera vez la propagación de HCV en cultivo celular (37). Estos estudios animaron a otros expertos a incrementar la capacidad replicativa de sus clones moleculares hasta forzar su propagación en cultivo celular mediante la introducción de mutaciones adaptativas. Gracias a estos clones moleculares infecciosos, se ha podido profundizar en el estudio tanto de aspectos básicos como más aplicados en el campo de la hepatitis C (38).

Si bien los clones moleculares infecciosos han sido muy importantes para la generación de conocimiento fundamental sobre el virus, los sistemas de replicón puestos a punto por los grupos del Dr. Rice y del Dr. Bartenschlager han sido instrumentales para que en la actualidad se esté considerando la erradicación del virus de la hepatitis C mediante terapias con antivirales de acción directa (39). La identificación de las actividades proteasa y polimerasa en NS3/4A (40) y NS5B respectivamente y la determinación de sus estructuras tridimensionales (41-43) permitió iniciar el camino para el diseño de compuestos antivirales frente a estas dianas virales (44). No obstante, los modelos de replicación en replicones han aportado varias ventajas adicionales. En primer lugar, permitieron validar compuestos seleccionados en ensayos enzimáticos *in vitro*, verificando que fueran efectivos en un sistema celular donde los complejos de replicación podrían no alcanzarse, al encontrarse en complejos de replicación membranosos dentro de la célula (45). En segundo lugar, los replicones permitieron acelerar el estudio de mecanismos de acción y de determinar los perfiles de resistencia a los fármacos. Esto se debe a la posibilidad de imponer una doble presión selectiva de manera experimental: i) sobre el gen marcador presente en el replicón para forzar la selección de replicones funcionales; ii) sobre la diana terapéutica viral, en presencia de cantidades crecientes de compuesto antiviral, de forma que se seleccionan replicones portadores de mutaciones de escape para dicho compuesto. Esto ha permitido determinar la barrera genética a resistencia frente a distintos fármacos, así como las mutaciones asociadas a resistencia, una información de gran relevancia clínica a la hora de diseñar las combinaciones de fármacos para los tratamientos (46).

Además, nuevas generaciones de replicones en los que el marcador del primer cistrón de los replicones ha sido sustituido por marcadores fácilmente medibles, como el gen de la luciferasa o de una proteína fluorescente, han permitido cribar colecciones de compuestos sin necesidad de conocer la diana molecular. En este sentido, los inhibidores más potentes en el arsenal terapéutico frente al HCV, han sido descubiertos mediante cribado en un sistema basado en fenotipo, no sesgado a ninguna de las dianas moleculares conocidas (47). Por ejemplo, estudios de perfil genético a resistencia llevaron a identificar a NS5A, una proteína multifuncional sin actividad enzimática conocida, como diana molecular de fármacos como daclatasvir o ledipasvir, esenciales en el tratamiento de la hepatitis C, pero sin un mecanismo molecular plenamente esclarecido a día de hoy (47).

El cambio de paradigma en el tratamiento de la hepatitis C vino dado por la aprobación de un inhibidor de la actividad polimerasa de NS5B, sofosbuvir, en forma de precursor del principio activo que aseguraba un enorme incremento en la eficacia de versiones anteriores de los inhibidores basados en nucleósidos modificados (48). Dicho antiviral de acción directa fue el primero en ser aprobado para su uso en ausencia de interferón en la terapia. La concepción y síntesis del sofosbuvir, la llevó a cabo el Dr. Sofía, lo que le valió junto a los desarrolladores de los replicones subgenómicos de HCV, los Dres. Rice y Bartenschlager el Premio Lasker en 2016 (<http://www.laskerfoundation.org/awards/show/hepatitis-c-replicon-system-and-drug-development/>). Sofosbuvir, en combinación con otros fármacos frente a la proteasa o NS5A anteriormente mencionados, permitió dejar atrás la era de los tratamientos basados en interferón, tratamientos largos, de baja eficacia y plagados de efectos secundarios, y abrir la era de los antivirales de acción directa (DAA), con tasas de éxito cercanas al 100% en todas las poblaciones tratadas con un tratamiento oral de 8-12 semanas (44,45). Este hecho ha llevado a la OMS a elaborar un plan ambicioso de erradicación del virus de la hepatitis C, con el objetivo de reducir la incidencia en un 80% y mortalidad asociada a hepatitis C en un 65% para el año 2030, con un amplio arsenal de antivirales de acción directa como única herramienta terapéutica. En España, se ha elaborado un Plan Estratégico Nacional para la eliminación de la hepatitis C en los que ya se han tratado unos 144.000 pacientes con una tasa de curación del 95% (<https://www.mscbs.gob.es/ciudadanos/enfLesiones/enfTransmisibles/-hepatitisC/PlanEstrategicoHEPATITISC/home.htm>).

A pesar de la calidad y cantidad de los DAA disponibles, el éxito de los planes de erradicación de la OMS pasan por la implementación de diversas políticas sanitarias que incluyen el control de calidad de los bancos de sangre así como políticas activas de reducción de daño en individuos adictos a drogas inyectables, entre



otras (49). No obstante, entre los principales desafíos a día de hoy se encuentra el de identificar, diagnosticar y tratar a los más de 30 millones de personas infectadas que no han sido diagnosticadas y que, por lo tanto, desconocen que están infectadas por el virus (49).

4. REFERENCIAS

1. Foreman KJ, Marquez N, Dolgert A, Fukutaki K, Fullman N, McGaughey M, et al. Forecasting life expectancy, years of life lost, and all-cause and cause-specific mortality for 250 causes of death: reference and alternative scenarios for 2016-40 for 195 countries and territories. *Lancet* 2018; 392(10159):2052-90.
2. Guidotti LG, Chisari FV. Immunobiology and pathogenesis of viral hepatitis. *Annu Rev Pathol* 2006; 1 (1):23-61.
3. Wieland SF, Chisari FV. Stealth and cunning: hepatitis B and hepatitis C viruses. *J Virol* 2005; 15: 9369-80.
4. Wong DT, Mihm MD, Boyer JL, Jain D. Historical Path of Discovery of Viral Hepatitis. *Harvard Medical Student Review* 2015; 3:18-36.
5. Stokes JH. Epidemic infectious jaundice and its relation to the therapy of syphilis. *Archives of Internal Medicine American Medical Association* 1920; 1;26(5):521-43.
6. Blumberg BS, Alter HJ, Visnich S. A "new" antigen in leukemia sera. *JAMA American Medical Association* 1965;191(7):541-6.
7. Alter HJ, Holland PV, Purcell RH, Lander JJ, Feinstone SM, Morrow AG, et al. Posttransfusion hepatitis after exclusion of commercial and hepatitis-B antigen-positive donors. *Ann Intern Med.* 1972 ; 77(5):691-9.
8. Feinstone SM, Kapikian AZ, Purcell RH. Hepatitis A detection by immune electron microscopy of a viruslike antigen associated with acute illness. *Science* 1973; 182(4116):1026-8.
9. Feinstone SM, Kapikian AZ, Purcell RH, Alter HJ, Holland PV. Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B. *N Engl J Med.* 1975; 292(15):767-70.
10. Alter HJ. The dominant role of non-A, non-B in the pathogenesis of post-transfusion hepatitis: a clinical assessment. *Clin Gastroenterol* 1980; 9(1):155-70.
11. Houghton M. The long and winding road leading to the identification of the hepatitis C virus. *J Hepatol* 2009; 51(5):939-48.
12. He LF, Alling D, Popkin T, Shapiro M, Alter HJ, Purcell RH. Determining the size of non-A, non-B hepatitis virus by filtration. *J Infect Dis.* 1987; 156(4):636-40.
13. Feinstone SM, Mihalik KB, Kamimura T, Alter HJ, London WT, Purcell RH. Inactivation of hepatitis B virus and non-A, non-B hepatitis by chloroform. *Infect Immun. American Society for Microbiology Journals* 1983; 41(2):816-21.
14. McCullagh KG, Davies JA, Sim IS, Dawson KM, O'Neill GJ, Doel SM, et al. Biological properties of human interferon beta 1 synthesized in recombinant bacteria. *J Interferon Res* 1983;3(1):97-111.
15. Shimizu YK, Oomura M, Abe K, Uno M, Yamada E, Ono Y, et al. Production of antibody associated with non-A, non-B hepatitis in a chimpanzee lymphoblastoid cell line established by in vitro transformation with Epstein-Barr virus. *Proc Natl Acad Sci USA. National Academy of Sciences* 1985; 82(7):2138-42.
16. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989; 244(4902):359-62.
17. Kuo G, Choo Q, Alter H, Gitnick G, Redeker A, Purcell R, et al. An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science* 1989; 244(4902):362-4.
18. Alter HJ, Purcell RH, Shih JW, Melpolder JC, Houghton M, Choo QL, et al. Detection of antibody to hepatitis C virus in prospectively followed transfusion recipients with acute and chronic non-A, non-B hepatitis. *N Engl J Med* 1989; 321(22):1494-500.
19. Chien DY, Choo QL, Tabrizi A, Kuo C, McFarland J, Berger K, et al. Diagnosis of hepatitis C virus (HCV) infection using an immunodominant chimeric polyprotein to capture circulating antibodies: reevaluation of the role of HCV in liver disease. *Proc Natl Acad Sci* 1992; 89(21):10011-5.
20. Kleinman S, Alter H, Busch M, Holland P, Tegtmeyer G, Nelles M, et al. Increased detection of hepatitis C virus (HCV)-infected blood donors by a multiple-antigen HCV enzyme immunoassay. *Transfusion* 1992; 32(9):805-13.
21. Grakoui A, Wychowski C, Lin C, Feinstone SM, Rice CM. Expression and identification of hepatitis C virus polyprotein cleavage products. *J Virol. American Society for Microbiology Journals* 1993; 67(3):1385-95.
22. Lin C, Lindenbach BD, Prágai BM, McCourt DW, Rice CM. Processing in the hepatitis C virus E2-NS2 region: identification of p7 and two distinct E2-specific products with different C termini. *J Virol* 1994; 68(8):5063-73.
23. Dubuisson J, Hsu HH, Cheung RC, Greenberg HB, Russell DG, Rice CM. Formation and intracellular localization of hepatitis C virus envelope glycoprotein complexes expressed by recombinant vaccinia and Sindbis viruses. *J Virol* 1994; 68(10):6147-60.
24. Grakoui A, McCourt DW, Wychowski C, Feinstone SM, Rice CM. A second hepatitis C virus-encoded proteinase. *Proc Natl Acad Sci* 1993; 90(22):10583-7.
25. Lin C, Rice CM. The hepatitis C virus NS3 serine proteinase and NS4A cofactor: establishment of a cell-free trans-processing assay. *Proc Natl Acad Sci* 1995; 92(17):7622-6.
26. Kolykhalov AA, Agapov EV, Blight KJ, Mihalik K, Feinstone SM, Rice



- CM. Transmission of hepatitis C by intrahepatic inoculation with transcribed RNA. *Science* 1997; 277(5325):570–4.
27. Yanagi M, Purcell RH, Emerson SU, Bukh J. Transcripts from a single full-length cDNA clone of hepatitis C virus are infectious when directly transfected into the liver of a chimpanzee. *Proc Natl Acad Sci* 1997; 94(16):8738–43.
28. Sakai A, Claire MS, Faulk K, Govindarajan S, Emerson SU, Purcell RH, et al. The p7 polypeptide of hepatitis C virus is critical for infectivity and contains functionally important genotype-specific sequences. *Proc Natl Acad Sci* 2003; 100(20):11646–51.
29. Blight KJ, McKeating JA, Rice CM. Highly permissive cell lines for subgenomic and genomic hepatitis C virus RNA replication. *J Virol* 2002; 76(24):13001–14.
30. Lohmann V, Körner F, Koch J, Herian U, Theilmann L, Bartenschlager R. Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science* 1999; 285(5424):110–3.
31. Blight KJ, Kolykhalov AA, Rice CM. Efficient initiation of HCV RNA replication in cell culture. *Science* 2000; 290(5498):1972–4.
32. Kato T, Date T, Miyamoto M, Furusaka A, Tokushige K, Mizokami M, et al. Efficient replication of the genotype 2a hepatitis C virus subgenomic replicon. *YGAST* 2003; 125(6):1808–17.
33. Pietschmann T, Kaul A, Koutsoudakis G, Shavinskaya A, Kallis S, Steinmann E, et al. Construction and characterization of infectious intragenotypic and intergenotypic hepatitis C virus chimeras. *Proc Natl Acad Sci* 2006; 103(19):7408–13.
34. Wakita T, Pietschmann T, Kato T, Date T, Miyamoto M, Zhao Z, et al. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med* 2005; 11(7):791–6.
35. Lindenbach BD, Evans MJ, Syder AJ, Wölk B, Tellinghuisen TL, Liu CC, et al. Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science* 2005; 309(5734):623–6.
36. Lindenbach BD, Meuleman P, Ploss A, Vanwolleghe T, Syder AJ, McKeating JA, et al. Cell culture-grown hepatitis C virus is infectious in vivo and can be recultured in vitro. *Proc Natl Acad Sci* 2006; 103(10):3805–9.
37. Zhong J, Gastaminza P, Cheng G, Kapadia S, Kato T, Burton DR, et al. Robust hepatitis C virus infection in vitro. *Proc Natl Acad Sci* 2005; 102(26):9294–9.
38. Steinmann E, Pietschmann T. Cell Culture Systems for Hepatitis C Virus. In: Bartenschlager R, editor. *Hepatitis C Virus: From Molecular Virology to Antiviral Therapy*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2013. pp. 17–48. (Current Topics in Microbiology and Immunology; vol. 369).
39. Kim NG, Kullar R, Khalil H, Saab S. Meeting the WHO hepatitis C virus elimination goal: Review of treatment in paediatrics. *J Viral Hepat*. 2020; 27(8):762–9.
40. Grakoui A, McCourt DW, Wychowski C, Feinstone SM, Rice CM. Characterization of the hepatitis C virus-encoded serine proteinase: determination of proteinase-dependent polyprotein cleavage sites. *J Virol* 1993; 67(5):2832–43.
41. Kim JL, Morgenstern KA, Lin C, Fox T, Dwyer MD, Landro JA, et al. Crystal structure of the hepatitis C virus NS3 protease domain complexed with a synthetic NS4A cofactor peptide. *Cell* 1996; 87(2):343–55.
42. Lesburg CA, Cable MB, Ferrari E, Hong Z, Mannarino AF, Weber PC. Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase from hepatitis C virus reveals a fully encircled active site. *Nat Struct Biol* 1999; 6(10):937–43.
43. Bressanelli S, Tomei L, Roussel A, Incitti I, Vitale RL, Mathieu M, et al. Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci* 1999; 96(23):13034–9.
44. Lamarre D, Anderson PC, Bailey M, Beaulieu P, Bolger G, Bonneau P, et al. An NS3 protease inhibitor with antiviral effects in humans infected with hepatitis C virus. *Nature* 2003; 426(6963):186–9.
45. Moradpour D, Penin F, Rice CM. Replication of hepatitis C virus. *Nat Rev Micro* 2007; 5(6):453–63.
46. Bartenschlager R. Hepatitis C virus replicons: potential role for drug development. *Nat Rev Drug Discov* 2002; 1(11):911–6.
47. Gao M, Nettles RE, Belema M, Snyder LB, Nguyen VN, Fridell RA, et al. Chemical genetics strategy identifies an HCV NS5A inhibitor with a potent clinical effect. *Nature* 2010; 465(7294):96–100.
48. Sofia MJ. Beyond sofosbuvir: what opportunity exists for a better nucleoside/nucleotide to treat hepatitis C? *Antiviral Res*. 2014; 107:119–24.
49. Heffernan A, Cooke GS, Nayagam S, Thursz M, Hallett TB. Scaling up prevention and treatment towards the elimination of hepatitis C: a global mathematical model. *Lancet* 2019; 393(10178):1319–29.



EL PREMIO NOBEL EN QUÍMICA 2020

Juan-Ramón Lacadena

Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia

LA TÉCNICA CRISPR-Cas9: CRÓNICA DE UN PREMIO ANUNCIADO

En el año 2017 publiqué mis reflexiones sobre los aspectos científicos y éticos de la técnica CRISPR-Cas9 y en esa ocasión, como en muchas otras, vaticiné que, antes o después, sería objeto del premio Nobel. Y efectivamente, así fue: El 7 de octubre de 2020, la Real Academia de Ciencias de Suecia concedió el Premio Nobel en Química 2020 a las doctoras Emmanuelle Charpentier y Jennifer A. Doudna "por el desarrollo de un método para la edición genómica". Parafraseando el título de la famosa novela "Crónica de una muerte anunciada" del Premio Nobel Gabriel García Márquez, se hacía realidad la "crónica de un premio anunciado".

Como profesor de Genética, la noticia me ha alegrado mucho, pero me ha dejado un sabor agrídulce porque muchos pensábamos que cuando se diera el Premio Nobel a la técnica CRISPR-Cas9 de edición genómica también se debería incluir al científico español Francisco Juan Martínez Mojica que describió, estudió y bautizó las secuencias CRISPR en los genomas de arqueas y bacterias. CRISPR es el acrónimo de *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* (repeticiones palindrómicas cortas interespaçadas regularmente agrupadas) y *Cas* el acrónimo de *CRISPR associated* (asociada a CRISPR).

Por *edición genómica* se entiende un tipo de ingeniería genética en la que el ADN es insertado, eliminado o reemplazado en el genoma de un organismo utilizando enzimas del tipo nucleasas (denominadas "tijeras moleculares"). Las nucleasas producen roturas de doble cadena (*DSB*) en lugares precisos del genoma y las dobles roturas del ADN pueden ser reparadas por mecanismos de unión de extremos no homólogos (*NHEJ*) o mediante reparación dirigida por homología (*HDR*), dando lugar a mutaciones controladas (*edición*). La edición genómica se denomina coloquialmente como la técnica de "corta y pega". En la actualidad se dispone especialmente de cuatro tipos de nucleasas: *meganucleasas*, *nucleasas de dedo de zinc* (*ZF nuclease*), *Talen* (*Transcription Activator-Like Effector-based Nuclease*) y el sistema *CRISPR-Cas*.

Con la llegada de la técnica CRISPR-Cas9 puede decirse que se ha popularizado o "democratizado" el "tiro al blanco génico" (*gene target*). En efecto, mientras que la utilización de las meganucleasas necesitan 4-5 años de trabajo y un costo de 6.000 € para llevar a cabo una investigación de edición, las ZF nucleasas implican un costo 30.000 €, las TALEN implican un tiempo de 3-4 meses y un costo de 10.000 €, con la CRISPR-Cas9 se necesitan solamente 2-3 semanas de trabajo y un coste de 20-30 €.

Una breve historia de CRISPR-Cas9

Aunque la primera descripción de la existencia de las secuencias CRISPR en el genoma de las bacterias se hizo en 1987 por un grupo japonés, sin embargo se debe principalmente a los trabajos del investigador español Francisco Juan Martínez Mojica (Francis Mojica) (3, 4, 5) en los años 1993, 2000 y 2005 el estudio de unas secuencias de ADN repetidas (las secuencias CRISPR) descubiertas en bacterias y en arqueas—que posteriormente se descubrió su relación con el sistema inmunitario de la bacteria para defenderse de los ataques de los virus que las atacan— se han convertido en una de las herramientas biotecnológicas más eficaces para modificar el genoma (edición genómica) de cualquier clase de organismo. Sin embargo, fueron Emmanuelle Charpentier y Jennifer A. Doudna quienes se dieron cuenta que este sistema ancestral de defensa de las bacterias contra la infección por virus podía convertirse en una herramienta para la modificación dirigida del material genético de otros seres vivos.

La característica más relevante que diferencia a los métodos de corrección del ADN por transgénesis es que el transgén se integre al azar en el genoma o que se produzca el reemplazamiento del gen original. Por otro lado, una vez producida la doble rotura en la molécula de ADN puede haber dos rutas para fijar la rotura de la doble hélice: la *NHEJ* (unión de extremos no homólogos) que produce la disrupción génica (*INDEL*, inserciones y/o deleciones) y la *HDR* (reparación dirigida por homología) que da lugar a la reparación génica y a la edición.

El sistema CRISPR-Cas9 consta de dos elementos: una pequeña molécula de ARN (la parte CRISPR) que contiene una secuencia complementaria con la secuencia diana contra la que se dirige en el ADN, y una endonucleasa (denominada Cas9) que es una proteína con actividad enzimática capaz de cortar el ADN y hacerlo solamente donde le indique la pequeña molécula de ARN antes mencionada. Al producir la doble rotura en la molécula de ADN entran en acción otras enzimas existentes en las células que reparan el daño producido, pero que pueden generar errores al insertar o eliminar algunos nucleótidos en el lugar del corte; es decir, se genera una mutación en el gen afectado por el corte (*NHEJ*). Sin embargo, si se añade un tercer elemento al sistema CRISPR-Cas9 consistente en una molécula de ADN que tenga secuencias complementarias a la zona donde se producirá el corte y, además, se incorporan en esta secuencia algunos cambios específicos que no estuvieran en el genoma original, el sistema tenderá a utilizar esta molécula de ADN como molde para restaurar el corte cambiando así el genoma; es decir, editándolo (*edición genómica*). Como si de un procesador de textos se tratara, el sistema CRISPR-Cas9 y la molécula de ADN consiguen localizar un error y corregirlo en un gen o, viceversa, instaurar un error donde antes no lo había, reproduciendo así en un modelo animal experimental aquella mutación detectada en un paciente



afectado por una enfermedad. En otras palabras, somos capaces de reproducir en el genoma de los animales de experimentación las mismas mutaciones observadas en los pacientes.

En una revisión del tema, Lander (8) analizaba la contribución de diversos investigadores al desarrollo de los fundamentos y aplicaciones de la técnica CRISPR-Cas9. Los 12 “héroes CRISPR” — como él los llama— son, por orden de aparición en escena:

- Descubrimiento de CRISPR: Francisco Juan Martínez Mojica (1993)
- CRISPR es un sistema inmune adaptativo: F.J.M. Mojica (2005), Gilles Vergnaud (2005), Alexander Bolotin (2005)
- Evidencia experimental de que CRISPR confiere inmunidad adaptativa y utiliza una nucleasa: Philippe Horvath (2007)
- Programando CRISPR: John van der Oost (2008)
- Dianas CRISPR en el ADN: Luciano Marrafini (2008)
- Cas9 es guiada por crRNAs y crea dobles roturas en el ADN: Sylvain Moineau (2008)
- Reconstituyendo CRISPR en un organismo distante: Virginijus Siksnys (2011)
- Estudiando CRISPR in vitro: V. Siksnys (2012), Emmanuelle Charpentier (2012), Jennifer A. Doudna (2012)
- Edición genómica en células de mamíferos: Feng Zhang (2012, 2013), George Church (2013)

De los doce investigadores citados, hay cinco especialmente cualificados para ser merecedores del galardón Nobel que, por orden de aparición en escena —como se dice en los programas de representaciones teatrales— son los doctores Mojica, Charpentier, Doudna, Zhang y Church. Como las normas de concesión de los galardones dicen que no sean más de tres personas (a no ser que se trate de alguna organización), la Real Academia de Ciencias de Suecia, que otorga el Premio Nobel en Química, se vio en la necesidad de aplicar un juicio salomónico, a mi juicio equivocado, premiando solamente a Emmanuelle Charpentier y a Jennifer A. Doudna. En mi opinión, sin los descubrimientos básicos de la secuencia CRISPR que hizo el Dr. Mojica, las galardonadas con el Premio Nobel no hubieran podido desarrollar su técnica premiada y, por tanto, el Dr. Mojica debería haberles acompañado en el galardón. En la historia de los Premios Nobel, hay casos similares en los que se premiaba también la investigación básica que, muchos años después, servía de base a los trabajos de los premiados. En elegantes palabras del excluido Dr. Mojica, “han premiado a las personas que desarrollan la herramienta. No a quien sentó las bases [él mismo] ni a quienes primero la aplicaron [George Church y Feng Zhang]”.

Un comentario final: la Genética y los Premios Nobel

Una vez más, investigaciones genéticas —en este caso, año 2020, las llevadas a cabo por los Dres. Houghton y Rice con el virus de la hepatitis C y las de las Dras. Charpentier y Doudna con la técnica

CRISPR-Cas9— han sido galardonadas con el Premio Nobel. Utilizando palabras similares a las que usé en anteriores ocasiones semejantes a ésta, puedo señalar globalmente que investigaciones genéticas han sido galardonadas con el Premio Nobel en 56 ocasiones, correspondiendo el premio a 110 científicos del campo de la Genética o ciencias afines. De los 56 premios considerados, 42 pertenecen al ámbito de la Fisiología o Medicina, 13 a la Química y 1 de la Paz. De los 110 científicos galardonados, 83 corresponden a premios de Fisiología o Medicina, 26 de Química y 1 de la Paz. Sólo hay 10 mujeres entre los galardonados.

Me siento orgulloso de pensar que en los veinte años que van transcurridos del siglo XXI se ha premiado la investigación genética en 22 ocasiones, a saber: 2001, 2002, 2004, 2006, 2006, 2007, 2008, 2008, 2009, 2009, 2010, 2011, 2012, 2013, 2013, 2016, 2017, 2018, 2018, 2019, 2020, 2020.

REFERENCIAS

1. Lacadena JR. Edición genómica: Ciencia y Ética. Revista Iberoamericana de Bioética (online), Genética y Humanismo 2017; 3: 1-14. Basado en Montoliu L. Las herramientas CRISPR: Un regalo inesperado de las bacterias que ha revolucionado la biotecnología animal. <http://www.comunicabiotec.org> 2015 y en Serrugia D, Montoliu L. The new CRISPR-Cas system: RNA-guided genome engineering to efficiently produce any desired genetic alteration in animals. *Transgenic Res* 2014; 23:707-716.
2. Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M, Nakata A. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J Bacteriol* 1987; 169:5429-33.
3. Mojica FJM, Juez G, Rodríguez-Valera F. Transcription at different salinities of *Haloflex mediterranei* sequences adjacent to partially modified PstI sites. *Mol Microbiol* 1993; 9:613-21.
4. Mojica FJ, Díez-Villaseñor C, Soria E, Juez G. Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria. *Mol Microbiol* 2000; 36:244-6.
5. Mojica FJ, Díez-Villaseñor C, García-Martínez J, Soria E. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *J Mol Evol* 2005; 60:174-84.
6. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 2012; 337:816-21.
7. Montoliu L. Las herramientas CRISPR: Un regalo inesperado de las bacterias que ha revolucionado la biotecnología animal. Recuperado de <http://www.comunicabiotec.org> 2015.
8. Lander ES. The Heroes of CRISPR. *Cell* 2016; 164:18-28.

PREMIO NOBEL DE QUÍMICA 2020: UN PREMIO QUE SURGIÓ EN ESPAÑA Y QUE PASÓ DE LARGO

NOBEL PRIZE IN CHEMISTRY 2020: A PRIZE THAT AROSE IN SPAIN AND PASSED BY

Lluís Montoliu José

Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC) y Centro de Investigación Biomédica en Red en Enfermedades Raras (CIBERER-ISCIH)

RESUMEN

Las investigadoras Emmanuelle Charpentier y Jennifer Doudna han recibido el Premio Nobel de Química del año 2020 por “el desarrollo de un método de edición genética”, tal y como proclama la escueta pero suficiente justificación aportada por la Academia Sueca de Ciencias, responsable de la selección y elección de los premiados en esta categoría. La palabra CRISPR (acrónimo en inglés de *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) que corresponde, en español, a las repeticiones cortas palindrómicas agrupadas y regularmente espaciadas, descritas por el microbiólogo español de la Universidad de Alicante, Francisco Juan Martínez Mojica, no aparece en la frase resaltada del galardón pero, inmediatamente, el mundo entero supo que este premio Nobel de Química se lo llevaban las “CRISPR”, las famosas herramientas de edición genética, descritas inicialmente por Mojica como elementos de un complejo y eficaz sistema de defensa en procariontes y que, gracias al talento y la visión de estas dos investigadoras, fueron propuestas para ser utilizadas, fuera de contexto, para la edición de cualquier gen de cualquier ser vivo. En esta revisión señalaré los puntos clave que permitieron a Charpentier y Doudna obtener, merecidamente, este premio y, por supuesto, subrayaré el papel que han jugado muchos otros investigadores, como el propio Mojica.

ABSTRACT

Two researchers, Emmanuelle Charpentier and Jennifer Doudna, have received the 2020 Nobel Prize in Chemistry for “the development of a genetic editing method”, as proclaimed by the brief but sufficient justification provided by the Swedish Academy of Sciences, responsible for the selection and election of the winners in this category. The word CRISPR (acronym for Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats), described by the Spanish microbiologist at the University of Alicante, Francisco Juan Martínez Mojica, does not appear in the highlighted phrase of the award but, immediately, the whole world knew that this Nobel Prize in Chemistry was won by the “CRISPR”, the famous gene editing tools, initially described by Mojica as elements of a complex and effective defense system in prokaryotes. And, thanks to the talent and vision of these two researchers, CRISPR were proposed to be used, out of context, for editing any gene of any living organism. In this review I will point out the key points that allowed Charpentier and Doudna to deserve this award and of course I will underline the role that many other researchers have played, including that of Mojica himself.

Palabras Clave:

CRISPR
edición genética
CRISPR-Cas
terapia génica
nucleasas

Keywords:

CRISPR
genome editing
CRISPR-Cas
gene therapy
nucleases



1. INTRODUCCIÓN

Emmanuelle Charpentier, microbióloga francesa que trabajó desde diversos laboratorios hasta recabar como directora de un centro Max-Planck en Berlín (Alemania), y Jennifer Doudna, bioquímica norteamericana, de la Universidad de California en Berkeley, no se conocían personalmente a principios del año 2011. En marzo de ese año tuvo lugar una reunión internacional sobre "Regulación por ARN en Bacterias" en San Juan, Puerto Rico (EE.UU.), y allí fue donde coincidieron estas dos investigadoras por vez primera. Charpentier, más joven que Doudna, que ya era una investigadora senior, con prestigio y reconocimiento, fue quien se acercó a proponer una colaboración científica para descifrar el mecanismo de acción de uno de estos sistemas CRISPR-Cas (Cas se refiere al acrónimo en inglés CRISPR-associated protein), en el que las dos habían estado investigando, desde un punto de vista de microbiología molecular (Emmanuelle Charpentier) y desde un punto de vista de bioquímica estructural (Jennifer Doudna). Quince meses después el resultado de esa colaboración aparecía publicado en la revista *Science* (1), en el primer y único artículo científico en el que estas dos investigadoras colaboraron como co-titulares de la investigación. El artículo que las llevó, ocho años y unos meses después, a conseguir el Premio Nobel de Química.

El artículo de Charpentier y Doudna (1) describía la simplicidad estructural y funcional del mecanismo de acción del sistema CRISPR-Cas9 de la bacteria *Streptococcus pyogenes*, patógena para los seres humanos, causa frecuente de otitis y laringitis. En el citado estudio, publicado en el mes de junio de 2012, las dos investigadoras galardonadas, junto a sus colaboradores, describieron que la nucleasa Cas9 cortaba, in vitro, guiada por una molécula de ARN (crRNA), descrita por el laboratorio de John van der Oost (2), y que, a su vez, se apareaba con otro ARN de pequeño tamaño (tracrARN) que era quien atenazaba a la proteína Cas9. Este último ARN había sido descrito un año antes por el laboratorio de Emmanuelle Charpentier (3). El artículo seminal de las dos investigadoras (1) aportó un detalle especial, que muy probablemente contribuyó al éxito inmediato y a la expansión internacional de estas herramientas. Charpentier y Doudna optaron por fusionar las dos moléculas de ARN en una sola, a través de una secuencia de unión (linker) y el resultado fue el denominado sgARN (guía sintética de ARN) o, simplemente, gARN (guía de ARN) que convertía al sistema CRISPR-Cas9 en binario (1). Solo dos componentes eran necesarios para trasladar los posibles beneficios de las nuevas herramientas CRISPR-Cas9 a cualquier entorno: la nucleasa Cas9 y la guía de ARN (sgARN). El artículo de Charpentier y Doudna terminaba con una frase premonitrice del éxito que acom-

pañaría al nuevo método que lanzaban en 2012: "Proponemos una metodología alternativa basada en la proteína Cas9 programada por ARN que puede aportar un potencial considerable para las aplicaciones de inactivación y edición génica". No se equivocaban. En efecto, ocho años más tarde ese artículo las llevó al más alto reconocimiento que puede recibir un científico: el Premio Nobel de Química.

Es relevante indicar que el celebrado artículo de 2012 fue, en realidad, la única ocasión que colaboraron experimentalmente Charpentier y Doudna, en igualdad de condiciones. Dos años más tarde Charpentier colaboró en un artículo de biología estructural del laboratorio de Doudna, que determinaba cómo la proteína Cas9 cambiaba de conformación al interactuar con las moléculas de ARN (4). Posteriormente aparecieron juntas en dos de las primeras revisiones que se publicaron sobre el tema (5, 6), y en una obra colectiva adicional de posicionamiento sobre el impacto de la edición génica (7), pero lo cierto es que se trata en esta ocasión de un Premio Nobel basado en un único trabajo experimental, una única publicación (1), que obviamente ha tenido un impacto enorme en biología, biotecnología y biomedicina. De ahí se desprende la justificación del galardón conseguido conjuntamente por estas dos investigadoras, la primera vez que se otorga un Premio Nobel a dos investigadoras.

Todo lo anterior es cierto. Pero no es menos cierto que Charpentier y Doudna propusieron, pero no demostraron, que los sistemas CRISPR-Cas9 de procariontes podrían ser utilizados como herramientas de edición génica. Este honor les corresponde, conjuntamente, a los laboratorios de Feng Zhang (Instituto BROAD, del MIT) y de George Church (Universidad de Harvard) quienes publicaron sendos manuscritos en enero de 2013 precisamente llevando a la práctica la propuesta de las investigadoras. En efecto, en dos publicaciones que aparecieron en la revista *Science* a principios de 2013 estos dos investigadores de Boston compartieron con el mundo el éxito que habían tenido editando células de ratón y células humanas (8, 9). Fue entonces cuando empezó la revolución CRISPR, cuando el resto del mundo empezó a descubrir las poderosas herramientas CRISPR, para editar cualquier gen de cualquier organismo (10).

Sin embargo, junto a Charpentier, Doudna, Zhang y Church, siguen faltando muchos investigadores. Siguen faltando todos aquellos microbiólogos moleculares que, durante más de veinte años, antes que se descubriera la potencial aplicación de los sistemas CRISPR-Cas como herramientas de edición génica, se entretuvieron a describir este peculiar, fascinante, complejo y muy eficaz sistema de defensa que usan los procariontes para defenderse de moléculas de ADN invasoras, sean virus o plásmidos (11).



2. EL ORIGEN PROCARIOTA DE LOS SISTEMAS CRISPR-CAS

Realmente la historia de este Premio Nobel de Química 2020 se remonta al año 1987. Fue entonces cuando un equipo de microbiólogos japoneses se percató de la existencia de unas curiosas repeticiones en el genoma de la proteobacteria *Escherichia coli*, espaciadas por secuencias diversas (12). Cuatro años más tarde otros microbiólogos holandeses también las reportaron en el genoma de *Mycobacterium tuberculosis*, las micobacterias que causan la tuberculosis en personas y en animales (13). Pero no fue hasta 1993 cuando apareció el primer trabajo publicado de un microbiólogo español, Francisco Juan Martínez Mojica, también conocido como Francis Mojica, quien, desde la Universidad de Alicante, junto a su grupo de investigación, localizó estas mismas repeticiones y espaciadores en el genoma de otro procarionte, de la arquea *Haloferax mediterranei*, microorganismo habitual de las salinas, aislado anteriormente por su laboratorio en las Salinas de Santa Pola (Alicante). En esta primera publicación, Mojica describía repeticiones similares a las reportadas por los equipos japoneses y holandeses, pero esta vez en una arquea (14).

A diferencia de los microbiólogos japoneses y holandeses, Mojica se dio cuenta de la relevancia de que tres procariontes muy alejados evolutivamente, y con hábitats tan dispares (intestinos, pulmones y salinas, respectivamente), compartieran un patrón de repeticiones de secuencias en su ADN, en sus genomas. Descartada por físicamente improbable la transmisión horizontal tan solo quedaba suponer una evolución convergente en tres linajes, posible pero altamente improbable. O asumir que aquella insólita organización de un fragmento del ADN de todos estos microorganismos respondiera a que lo habían heredado de un ancestro común. Sin embargo, la consulta del árbol filogenético de los procariontes sugiere que el ancestro común más próximo de las tres especies era verdaderamente las primeras células que aparecieron en nuestro planeta, probablemente hace más de 3.500 millones de años. Y, de todo ello se deducía que una peculiar estructura genómica que se había mantenido tanto tiempo tenía que ser necesariamente funcionalmente relevante para estos seres vivos. Y por todo ello Francis Mojica decidió dedicar su carrera profesional a investigar cuál podría ser la función de estas repeticiones de secuencias de ADN (15).

La primera idea de Mojica fue pensar que estas repeticiones podrían tener algo que ver con la replicación y la partición de replicones en la arquea *Haloferax mediterranei* (16), algo que después se comprobó que no era una hipótesis correcta, aunque esta publicación recoge las primeras evidencias de que estas secuencias repetitivas eran activas, se transcribían a ARN. Mojica siguió recopilando la presencia de estos elementos repetidos en el genoma de muchos procariontes cuya secuencia se empezaba a conocer y publicó

el primer listado de secuencias repetidas de diversos microorganismos, en el que incluía algunos elementos descritos en el genoma de las mitocondrias de leguminosas (relacionado con el origen procarionte de estos orgánulos subcelulares) (17). Hasta entonces, cada grupo que reportaba secuencias repetidas de estas características las denominaba de una forma distinta. Pero en noviembre de 2001 Francis Mojica le propuso a Ruud Jansen una palabra: CRISPR (acrónimo en inglés de *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) que inmediatamente hizo fortuna y se usó por primera vez en un artículo de Jansen en el que describía la existencia de genes colindantes a las repeticiones, que intuía debían estar relacionados, y que, por ello, las proteínas codificadas se nombraron como Cas (acrónimo en inglés de *CRISPR associated protein*) (18).

La contribución esencial de Mojica para descifrar el significado de las repeticiones CRISPR y de los espaciadores con secuencias únicas que había entre aquellas no tardaría en llegar. En verano de 2003 Mojica se percató de que algunos espaciadores eran fragmentos de genomas de virus que infectan a bacterias (bacteriófagos). Y que, cuando esto sucedía, la bacteria que portaba ese fragmento del virus era resistente a la infección por ese mismo virus. Había encontrado la razón de ser de los sistemas CRISPR. Se trataba de un sistema inmunitario de los procariontes de base genética, de defensa contra los virus, que se podía transmitir entre generaciones y que era adaptativo, pues al ir añadiendo fragmentos de nuevos virus podía conferirles resistencia a las bacterias y arqueas a todos esos nuevos invasores. Le costó casi tres años encontrar una revista que publicara estos resultados sorprendentes, que la comunidad científica recibió con escepticismo e incredulidad, pero finalmente aparecieron publicados en 2005 en la revista *Journal of Molecular Evolution* (19), convirtiéndose, años después, en su pasaporte para ser nominado también a los Premios Nobel, tal era la relevancia de su descubrimiento.

La explicación propuesta por Mojica para dar sentido funcional a los sistemas CRISPR fue confirmada experimentalmente dos años después, por dos investigadores Rodolphe Barrangou y Philippe Horvath, y sus colaboradores, quienes pudieron llevar a la práctica los experimentos que Mojica hubiera deseado hacer, confirmando que al añadir una nueva repetición CRISPR con un espaciador derivado de un virus la bacteria se volvía resistente al mismo, y al eliminar ese mismo espaciador se tornaba sensible a la infección (20).

Las contribuciones esenciales de Mojica al universo CRISPR todavía tuvieron otra aportación fundamental al ponerle nombre a la secuencia que aparecía conservada justo al lado de la secuencia de reconocimiento del fragmento del genoma del virus, que Mojica denominó como motivo adyacente al protoespaciador, o PAM (acrónimo en inglés de *Protospacer Adjacent Motif*). Ese era el truco ge-



nético que usaban las bacterias para diferenciar el ADN del virus, contra el que debían atacar, del fragmento del ADN del virus insertado en el genoma de la bacteria entre las repeticiones CRISPR, que no debían atacar (21). La existencia de estas señales presentes directamente en el genoma de los virus, adyacentes a la secuencia de reconocimiento, ya había sido intuida por otros investigadores (22), que eran diversas según qué bacteria o arquea, o qué nucleasa Cas se tratara. Y esta es la razón biológica por la que a la hora de diseñar las guías de ARN para dirigir los sistemas CRISPR-Cas a nuestro gen favorito debamos escoger no cualquier secuencia al azar sino solamente aquellas adyacentes a la señal PAM que requiere la nucleasa que vayamos a utilizar, una labor bioinformática de la que se encargan la mayoría de programas que diseñan guías de ARN para dirigir las nucleasas Cas a los genes de elección (23, 24).

Las aportaciones de Mojica al campo de las CRISPR vinieron acompañadas de otros hallazgos, igualmente relevantes. El investigador Luciano Marraffini, de origen argentino pero afincado en EE.UU., demostró en 2008 que los sistemas CRISPR-Cas no solo iban dirigidos contra el genoma de los virus sino también contra plásmidos (25). El grupo de John van der Oost descubrió las pequeñas moléculas de ARN (crARN) que dirigían a las nucleasas a la secuencia que debía ser cortada (2). El mecanismo de actuación se fue descubriendo paulatinamente, con contribuciones importantes de la propia Jennifer Doudna, que describió la actividad ADNasa en las nucleasas Cas asociadas a CRISPR (26) y el procesamiento del ARN transcrito de las agrupaciones CRISPR en fragmentos de menor tamaño (27). Sin embargo, probablemente el trabajo fundamental que dio la pista del mecanismo de acción de los sistemas CRISPR-Cas en procariotas surgió en 2010 del laboratorio del investigador canadiense Sylvain Moineau, quienes demostraron, por vez primera, que el mecanismo de defensa que aplicaban las bacterias para inactivar los virus y plásmidos invasores mediante los sistemas CRISPR-Cas estaba basado en el corte de sus ADNs, derivado de la actividad Cas de las nucleasas asociadas (28). El mecanismo de acción se completó con el trabajo de Emmanuelle Charpentier, quien en 2011 describió la otra molécula de ARN necesaria para que la guía de ARN acabara interaccionando con la endonucleasa Cas, que denominó tracrARN (3). El colofón final de todos estos más de veinte años de investigación básica sobre los sistemas CRISPR-Cas lo puso el artículo conjunto de las premiadas Charpentier y Doudna (1), aparecido en verano de 2012, por el que recibieron el Premio Nobel de Química del año 2020.

Son muchos pues los investigadores que, capitaneados por Francis Mojica, participaron en la exploración y búsqueda de explicaciones funcionales para el sistema CRISPR-Cas, antes que Emmanuelle Charpentier y Jennifer Doudna (11). Y muchos más los que comprobaron y usaron profusamente su propuesta de convertir este

sistema de defensa en una eficaz herramienta de edición genética (10, 11). Por ello el premio, merecido, que recibieron estas investigadoras llegó acompañado de decepciones, al ver que el comité de selección de la Academia Sueca de Ciencias había desestimado compartir el galardón con alguno de los otros investigadores mencionados, probablemente ante la difícil disyuntiva de tener que optar por uno frente a los demás. Y, con ello, España vio pasar de largo la oportunidad soñada de que Francis Mojica fuera el tercer científico español galardonado con un Premio Nobel, tras Santiago Ramón y Cajal (1906) y Severo Ochoa Albornoz (1959).

Mención especial merece un microbiólogo lituano, Virginijus Siksnys, de la Universidad de Vilnius, que, con su grupo, hizo también aportaciones fundamentales. En 2011 logró transferir con éxito un sistema CRISPR-Cas desde la bacteria gram-positiva *Streptococcus thermophilus* a *Escherichia coli*, una bacteria gram-negativa y evolutivamente muy alejada de la primera (29). La magnitud del experimento quedó eclipsada probablemente al tratarse del intercambio de secuencias entre dos microorganismos, sin reparar que estos tenían una distancia evolutiva enorme, de centenares de millones de años, tantos como los que separan un eucariota unicelular como la levadura *Saccharomyces cerevisiae* de nosotros. Siksnys también se percató del posible uso de los sistemas CRISPR-Cas de procariotas como posibles herramientas de edición genética y así lo plasmó tras realizar un estudio in vitro (30) análogo al realizado por las investigadoras Charpentier y Doudna. Sin embargo, Siksnys usó el sistema CRISPR-Cas de *Streptococcus thermophilus* y las investigadoras usaron el sistema CRISPR-Cas de *Streptococcus pyogenes*, del que conocían todos sus componentes, incluido el tracrARN, que desconocía y no utilizó el trabajo del investigador lituano (30). Este trabajo, que se envió a publicar antes del de las investigadoras, finalmente acabó publicado en la revista PNAS, en su número de septiembre de 2012 (30), tres meses después del artículo seminal de Charpentier y Doudna en la revista *Science* (1). Ambos trabajos describían el mecanismo de acción de sendos sistemas CRISPR-Cas en dos especies distintas del género *Streptococcus*. Ambos artículos predecían que el corte de secuencias específicas de ADN guiado por pequeñas moléculas de ARN podría tener utilidad en un sistema de edición genética universal, pero solo el trabajo de las dos investigadoras incluía la totalidad de los elementos de los sistemas CRISPR-Cas: la proteína Cas9, el crARN y el tracrARN. Esta última molécula faltaba en la receta metodológica de Siksnys. Sin embargo, creo que es necesario acreditar que fueron tres, por lo menos, los investigadores que, a lo largo de 2012, se percataron del uso de los sistemas CRISPR-Cas como herramientas de edición genética: Emmanuelle Charpentier, Jennifer Doudna y Virginijus Siksnys (11, 15).



3. LAS HERRAMIENTAS CRISPR-CAS DE EDICIÓN GENÉTICA: APLICACIONES, VENTAJAS Y LIMITACIONES

El escueto mensaje que anunciaba el Premio Nobel concedido a Charpentier y Doudna refería que la motivación de tan alta distinción se justificaba por el desarrollo de “un” método de edición genética. La elección del artículo indeterminado “un” y no su correspondiente determinado “el” por parte de la Academia de Ciencias Sueca no era baladí. Implícito en ese mensaje se trasladaba la información de que el sistema CRISPR-Cas por el que las dos investigadoras iban a recibir el Premio Nobel no era el único sistema de edición genética que la comunidad científica conocía. En efecto, por lo menos tres sistemas análogos adicionales, totalmente diferentes en su modo de acción, habían aparecido descritos antes que las herramientas CRISPR-Cas. En primer lugar, las meganucleasas de levaduras, descritas en 1995, seguidas de las nucleasas asociadas a dominios proteicos de dedos de cinc (ZFN, acrónimo en inglés de *Zinc-finger nucleases*), que aparecieron en 2001, y finalmente las TALEN (acrónimo en inglés de *Transcription activator-like effector nuclease*) cuyo uso se popularizó a partir de 2011 (10, 31, 32). Sin embargo la irrupción de las herramientas CRISPR-Cas en 2013, tras las primeras demostraciones funcionales por parte de Zhang (8) y Church (9), seguidas de muchos otros investigadores como la propia Jennifer Doudna (33), y el laboratorio de Rudolf Jaenisch, que demostró el uso de las CRISPR para la edición de ratones (34), y muchos otros investigadores (10, 11), rápidamente demostró su versatilidad, asequibilidad y facilidad de uso, propiedades que llevaron a las herramientas CRISPR-Cas de edición genética a desbancar a todas las anteriores. En apenas ocho años ya se han publicado 22.000 artículos científicos que usan estas herramientas CRISPR-Cas, unos 6.000 solamente en el último año contabilizado, 2020. Las anteriores herramientas se siguen utilizando, y en algunos casos han permitido resolver barreras insalvables que no habían podido superar las herramientas CRISPR, como la edición del ADN mitocondrial. Recientemente, David Liu, investigador del Instituto BROAD-MIT, ha conseguido editar el genoma de mitocondrias a través de una estrategia parecida a los editores de bases, combinando la actividad citidina deaminasa con TALEN lo cual permite llevar el complejo al interior de la mitocondria y editar específicamente su genoma (35).

Todas las herramientas de edición genética, en sus diferentes versiones, realizan esencialmente la misma función: cortar el ADN en secuencias específicas. Dicho corte dispara los mecanismos endógenos de reparación. Las dos rutas más importantes para restaurar la continuidad física del cromosoma son la unión de extremos no homólogos, que ocurre en todas las células, estén dividiéndose o no; y por otro lado la reparación dirigida por homología, en la

que se puede aportar al sistema un molde (un oligonucleótido de ADN de cadena sencilla, o un fragmento bicatenario de ADN) con homología a derecha e izquierda del corte realizado y con la posibilidad de insertar secuencias de novo, que no existían en el genoma original. Esta segunda ruta de reparación solamente opera en células que están en división. La resolución del primero de los mecanismos progresa al azar, añadiendo (insertando) y eliminando (delecionando) nucleótidos hasta que se logra alguna microhomología que permita reconstituir la continuidad física del cromosoma. Normalmente el resultado de la reparación mediante unión de extremos no homólogos es la inactivación génica, y el resultado de la reparación dirigida por homología la edición génica (5, 6, 10, 15).

Las aplicaciones de las herramientas CRISPR-Cas en biología, biotecnología y biomedicina son muy numerosas. El límite de las mismas está en la imaginación de los investigadores (15). Con ellas se pueden generar deleciones, inserciones, sustituciones, inversiones, duplicaciones, traslocaciones y cualquier otro reordenamiento cromosómico que deseemos modelar en células en cultivo o en organismos vivos. La obtención de nucleasas Cas9 con los centros activos de corte de ADN mutados, en una de las cadenas, las llamadas “nिकासas”, son en las dos cadenas, las llamadas Cas9 “muertas” o dCas9 (del inglés *dead Cas9*) ha abierto igualmente un campo inmenso a las modificaciones epigenéticas, al combinarlas con dominios activadores o supresores de la transcripción, o a la modificación directa de las secuencias de ADN, combinando las Cas9 modificadas con actividades químicas deaminasas, capaces de cambiar las bases nitrogenadas, de citosinas a timinas, o de adeninas a guaninas, sin necesidad de cortar el ADN, que son las variantes denominadas editores de bases. O incluso combinando las dCas9 o las nिकासas con dominios de transposasas o transcriptasas reversas, para unas nucleasas Cas9 inactivadas pero con propiedades excepcionales y potencialmente muy interesantes para aplicaciones biotecnológicas o biomédicas (36, 37).

En biología, las aplicaciones de las herramientas CRISPR han permitido analizar funcionalmente el genoma no codificante, que representa la mayoría del genoma en mamíferos (alrededor del 98%), y está lleno de secuencias repetidas, elementos móviles (transposones y retrotransposones) y también de secuencias de ADN reguladoras. La presencia de repeticiones inhabilita el uso de estrategias tradicionales, basadas en recombinación homóloga, como las que les permitieron a Evans, Capecchi y Smithies desarrollar la técnica de inactivación dirigida de genes en células pluripotentes embrionales de ratón, por la que recibieron el Premio Nobel de Fisiología o Medicina en 2007 (38). Sin embargo, las herramientas CRISPR-Cas apenas necesitan veinte ribonucleótidos para aparearse con los nucleótidos complementarios del gen deseado y promover el corte a través de la endonucleasa Cas9. Y si se combinan dos com-



plejos CRISPR-Cas9 para que actúen en cis se puede fomentar la delección de las secuencias que hay entre medio, siendo posible la eliminación específica de elementos reguladores, y el estudio de sus consecuencias en la expresión génica y el fenotipo del animal. Este tipo de estrategias ya ha sido aplicado con gran éxito en el estudio de los elementos reguladores del locus de la tirosinasa del genoma de ratón (39, 40, 41).

La posibilidad de inactivar múltiples genes es otra de las versatilidades de las herramientas CRISPR. Recientemente unos investigadores australianos consiguieron diseñar antídotos más efectivos contra el veneno de una medusa extremadamente venenosa, llamada avispa de mar, capaz de matar a una persona en 10 minutos al entrar en contacto con sus tentáculos. Expusieron su veneno a células humanas a las que previamente les habían transducido una biblioteca de lentivirus portadores de Cas9 y de guías ARN contra la práctica totalidad de los genes humanos (>18.000), de tal manera que cada célula tenía un gen inactivado. El veneno mató la mayoría de las células exceptuando aquellas en las que el sistema CRISPR había inactivado la ruta de entrada del veneno, lo cual permitió descubrir posibles antídotos (42).

Las aplicaciones de las CRISPR en investigación biomédica también han permitido generar los llamados ratones "avatar", en los que con el uso de estas herramientas de edición genética se puede reproducir exactamente la misma mutación encontrada en un paciente de una enfermedad congénita en el gen homólogo del genoma de ratón (15). Este nombre refiere a la película de ciencia ficción que con el mismo nombre dirigió James Cameron en 2009, en la que unos seres azules estaban de alguna manera conectados con las personas. El nombre avatar aprovecha la metáfora de esta conexión y con estos modelos animales se puede validar la seguridad y eficacia de tratamientos experimentales antes de exponerlos directamente a los pacientes.

En biotecnología animal las herramientas CRISPR se han utilizado ya con éxito en diversas intervenciones sobre genomas de animales de granja, para dotarles de características beneficiosas. La eliminación de un dominio del receptor CD163, que es el que usa el virus porcino del síndrome respiratorio y reproductor para entrar en las células y causar estragos en las granjas de cerdos, produce animales que ya no son infectables por este peligroso virus, que cada año provoca pérdidas millonarias en el sector (43). Una estrategia CRISPR también se usó para eliminar los retrovirus porcinos (PERV) que representan un peligro potencial en aplicaciones de xenotrasplantes. Primero en células porcinas (44) y luego directamente en animales (45) el uso de las herramientas CRISPR permitió generar cerdos carentes de PERV activos, eliminadas las 62 copias que contenían insertadas en su genoma, y, por lo tanto, más seguros para su utilización posterior en el desarrollo de xenotrasplantes.

En biotecnología vegetal la aplicación de tecnologías CRISPR ha permitido, por ejemplo, reproducir la domesticación del tomate, llevada a cabo tras siglos de mejora genética tradicional desde su variante silvestre a la especie actual, mediante la inactivación sistemática de apenas seis genes que permiten, entre otras funciones, aumentar el tamaño y el número de frutos por planta (46). En España, el investigador Francisco Barro (Instituto de Agricultura Sostenible, CSIC, Córdoba) aplicó las herramientas CRISPR para inactivar la mayor parte de genes de las gliadinas del trigo, principal componente del gluten, y así producir un cereal con bajo contenido en gluten cuya harina y pan resultantes pueden ser consumidos por personas con celiaquía (47). También las CRISPR se han aplicado en líneas de maíz para incorporar la mutación en el gen *waxy*, lo cual produce un cereal con un mayor contenido en amilopectina, de gran valor agroeconómico e industrial (48).

Otro de los campos que ha generado grandes expectativas con la aparición de las herramientas CRISPR es el control de las enfermedades infecciosas diseminadas por insectos, mayoritariamente mosquitos, tales como la fiebre amarilla, el dengue, el virus Zika, el chikunguya, o la malaria. Las estrategias CRISPR permiten forzar una herencia supramendeliana, gracias a desarrollos de impulso génico (en inglés *gene drive*) en los que el alelo modificado codifica para su propia modificación, lo cual garantiza que ambos alelos serán modificados a pesar de que solamente se hereda un alelo modificado de uno de los progenitores. Estas alteraciones en la distribución de alelos, mediadas por CRISPR, con objeto de interferir en el ciclo vital del mosquito, ya han sido exploradas experimentalmente en mosquitos que transmiten el plasmodio, causante de la malaria (49).

Más allá de las aplicaciones CRISPR en biología y biotecnología existen grandes esperanzas para poder aplicar estas técnicas en la clínica, con un objetivo biomédico, para curar o aliviar enfermedades de base genética que son incurables hoy en día. Naturalmente la posibilidad de usar CRISPR en personas exige una seguridad y eficacia que no necesitamos en modelos animales o vegetales, y que igualmente podemos gestionar adecuadamente en todos los seres vivos, menos en seres humanos, fundamentalmente por motivos éticos. Y es precisamente en las aplicaciones biomédicas donde se ponen de manifiesto, de forma más evidente, las limitaciones actuales de la tecnología CRISPR de edición genética, que son de dos tipos: la alteración no deseada de secuencias genómicas similares a las planeadas (en inglés los efectos *off-target*), y el mosaicismo (50, 51, 52). La primera limitación no es tan importante como parece, pues existen múltiples programas bioinformáticos que nos permiten seleccionar, cada vez mejor, guías de ARN más específicas y, además, aparecen nuevas endonucleasas recombinantes con mayor especificidad (23, 24). La segunda limitación es la fuente



de mayor incertidumbre en edición genética, pues al intentar unir un corte de doble cadena de ADN los sistemas de reparación endógenos cometen errores, nunca se acuerdan de lo que han hecho con la molécula anterior y, por ello, generan una diversidad alélica y genética que aparece sistemáticamente en todo experimento de edición genética con CRISPR (39, 40). En plantas y en animales podemos segregarse los alelos no deseados y las mutaciones inesperadas en otras partes del genoma mediante meiosis, mediante cruces, seleccionando entre la progenie resultante aquellas plantas o animales que porten solamente los alelos editados de interés. Pero obviamente este protocolo no lo podemos aplicar en seres humanos. Sería imprudente y éticamente inaceptable. Por ello hay que recomendar mucha cautela a la hora de aplicar estas tecnologías sobre seres humanos y, ante todo, fomentar el uso responsable de las técnicas de edición genética (53, 54, 55). Naturalmente existen también limitaciones de tipo legal que impiden, por ejemplo en España, modificar el genoma de la descendencia, al ser nuestro país signatario del Convenio de Asturias de 1997.

Desafortunadamente, el investigador chino He Jiankui, anunció en noviembre de 2018 que había editado embriones humanos con objeto de inactivar el gen que codifica el receptor CCR5, que es el que usa el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH, causante del SIDA) para entrar en los linfocitos. El irresponsable experimento se completó y los embriones humanos editados dieron lugar tres niñas, dos gemelas y otra niña, que tenían las mismas deficiencias y alteraciones inesperadas observadas en otras especies, como el ratón: mutaciones no deseadas y mosaicismos, sin posibilidad ética de gestionar esta irresponsabilidad adecuadamente. A finales de 2019, este investigador y sus colaboradores más cercanos fueron condenados a cárcel, al pago de una fuerte suma de dinero e inhabilitados de por vida, apenas un año después de conocerse el experimento. Este desafortunado experimento ilustra que no por el hecho de poder aplicar las herramientas CRISPR en muchos proyectos lo tenemos que hacer, que debemos recapacitar y, a falta de regulación específica, evitar el uso de estas herramientas en embriones humanos mientras no controlemos los resultados de la edición genética (15).

Para completar esta revisión, con motivo del Premio Nobel de Química 2020, otorgado a Emmanuelle Charpentier y Jennifer Doudna, es importante mencionar los, todavía escasos, pero incontestables éxitos que la tecnología CRISPR ha obtenido en biomedicina, en la clínica. En la actualidad (diciembre de 2020) existen más de 43 ensayos clínicos en marcha que usan las herramientas CRISPR con finalidad terapéutica y están en diferentes fases del proceso. Son fundamentalmente ensayos *ex vivo*, exceptuando un par *in vivo*. De estos últimos destaca el que se lleva a cabo en diversos hospitales de Europa y Norteamérica, encaminado a eliminar una mutación

crítica en un intrón del gen CEP290, causante de la Amaurosis Congénita de Leber de tipo 10. En este caso los pacientes, cuya degeneración progresiva de retina es irreversible, reciben una inyección intraocular y subretinal de los reactivos CRISPR-Cas incorporados en vectores virales adenoasociados (56).

En relación a los ensayos clínicos de terapia génica *ex vivo* hay que mencionar dos tipos de aproximaciones. En primer lugar el uso de las herramientas CRISPR de edición genética en pacientes con cáncer agresivo y refractario, resistentes a quimioterapia y radioterapia, como son el mieloma, el sarcoma y el melanoma. Recientemente hemos conocido unos resultados preliminares de una fase 1 (para evaluar seguridad) de unos pacientes a quienes se les extrajeron linfocitos que, una vez en el laboratorio, se les aplicó la tecnología CRISPR para inactivar el gen PD1 y el gen del receptor de células T, y antes de retornarlos al paciente se les añadió un nuevo receptor quimérico de células T dirigido contra antígenos de membrana de las células cancerosas (57). Y el mayor éxito de todos, la terapia que acabamos de conocer para enfermos de anemia falciforme y beta talasemias, enfermedades graves de la sangre que requieren transfusiones constantes y comprometen la vida de los afectados. En estos casos el gen de la beta-globina está mutado pero se reactiva la copia fetal de la gamma-globina, intacta, que reemplaza la beta-globina mutada, gracias a reducir significativamente la expresión del gen del represor *BCL11*, que mantiene la copia fetal inactiva en adultos, mediante el uso de una estrategia CRISPR que permite eliminar el potenciador transcripcional del gen *BCL11* (58). El gen no se puede eliminar por completo pues es necesario para el desarrollo y la diferenciación de otros tipos celulares del sistema hematopoyético. En la mayoría de estos casos se utilizan virus adenoasociados (AAV) para vehicular los reactivos CRISPR-Cas a la célula o tejido diana, sin embargo existe también la posibilidad de usar nanopartículas para dirigir las herramientas CRISPR y todos sus componentes al lugar adecuado del cuerpo mediante nanotecnología (59).

4. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

El Premio Nobel de Química 2020, otorgado merecidamente a Emmanuelle Charpentier y Jennifer Doudna, reconoció la visión que tuvieron al plantear, en junio de 2012, que un sistema de defensa antiviral bacteriano pudiera convertirse en una eficaz y precisa herramienta de edición genética, como así ha sido. Este galardón deja fuera a muchos otros investigadores que contribuyeron significativamente a establecer la tecnología CRISPR o que, mediante la investigación básica, sentaron las bases del origen y la función de los sistemas CRISPR en procariotas, como el microbiólogo español Francis Mojica.



Son muchas las aplicaciones de la tecnología CRISPR en biología, biotecnología y biomedicina, y muchos más los usos que veremos de este revolucionario método en un futuro próximo. Estos métodos han cambiado cómo se hacen los experimentos de modificación genética en los laboratorios de biología molecular de todo el mundo. Y gracias a su facilidad y asequibilidad, permiten avanzar a un gran número de laboratorios de muchos países que tradicionalmente se quedaban atrás con otras tecnologías que requerían equipamientos más sofisticados. También es oportuno resaltar la capacidad de adaptación de los métodos CRISPR, que pueden aplicarse para cualquier objetivo que persiga detectar, marcar o alterar cualquier material genético, sea ADN o ARN. Quizás la mejor prueba de la versatilidad de las herramientas CRISPR la tenemos en cómo han surgido aplicaciones relativas a la pandemia COVID-19, causada por el coronavirus SARS-CoV-2, tanto para diagnosticar la presencia del virus mediante métodos alternativos, basados en CRISPR (60, 61), el último de ellos desarrollado por el laboratorio de Jennifer Doudna (62), como para usar estas mismas herramientas como verdaderos antivirales, con variantes específicas de nucleasas Cas, como la Cas13d, capaz de cortar específicamente ARN y con ello degradar el genoma del coronavirus y de otros virus con genoma de ARN como el de la gripe (63).

5. REFERENCIAS

1. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 2012; 337:816-21.
2. Brouns SJ, Jore MM, Lundgren M, Westra ER, Slijkhuis RJ, Snijders AP, Dickman MJ, Makarova KS, Koonin EV, van der Oost J. Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. *Science* 2008; 321:960-4.
3. Deltcheva E, Chylinski K, Sharma CM, Gonzales K, Chao Y, Pizada ZA, Eckert MR, Vogel J, Charpentier E. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature* 2011; 471:602-7.
4. Jinek M, Jiang F, Taylor DW, Sternberg SH, Kaya E, Ma E, Anders C, Hauer M, Zhou K, Lin S, Kaplan M, Iavarone AT, Charpentier E, Nogales E, Doudna JA. Structures of Cas9 endonucleases reveal RNA-mediated conformational activation. *Science* 2014; 343:1247997.
5. Charpentier E, Doudna JA. *Biotechnology: Rewriting a genome*. *Nature* 2013; 495:50-1.
6. Doudna JA, Charpentier E. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* 2014; 346:1258096.
7. Bosley KS, Botchan M, Bredenoord AL, Carroll D, Charo RA, Charpentier E, Cohen R, Corn J, Doudna J, Feng G, Greely HT, Isasi R, Ji W, Kim JS, Knoppers B, Lanphier E, Li J, Lovell-Badge R, Martin GS, Moreno J, Nalini L, Pera M, Perry AC, Venter JC, Zhang F, Zhou Q. CRISPR germline engineering--the community speaks. *Nat Biotechnol*. 2015; 33:478-86.
8. Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, Hsu PD, Wu X, Jiang W, Marraffini LA, Zhang F. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* 2013; 339:819-23.
9. Mali P, Yang L, Esvelt KM, Aach J, Guell M, DiCarlo JE, Norville JE, Church GM. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science* 2013; 339:823-6.
10. Seruggia D, Montoliu L. The new CRISPR-Cas system: RNA-guided genome engineering to efficiently produce any desired genetic alteration in animals. *Transgenic Res*. 2014; 23:707-16.
11. Mojica FJM, Montoliu L. On the Origin of CRISPR-Cas Technology: From Prokaryotes to Mammals. *Trends Microbiol*. 2016; 24:811-20.
12. Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M, Nakata A. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J Bacteriol*. 1987; 169:5429-33.
13. Hermans PW, van Soolingen D, Bik EM, de Haas PE, Dale JW, van Embden JD. Insertion element IS987 from *Mycobacterium bovis* BCG is located in a hot-spot integration region for insertion elements in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. *Infect Immun*. 1991; 59:2695-705.
14. Mojica FJ, Juez G, Rodríguez-Valera F. Transcription at different salinities of *Haloferax mediterranei* sequences adjacent to partially modified PstI sites. *Mol Microbiol*. 1993; 9:613-21.
15. Montoliu L. *Editando genes: recorta, pega y colorea. Las maravillosas herramientas CRISPR*. 2ª edición, NextDoor Publishers, Pamplona, 2020.
16. Mojica FJ, Ferrer C, Juez G, Rodríguez-Valera F. Long stretches of short tandem repeats are present in the largest replicons of the Archaea *Haloferax mediterranei* and *Haloferax volcanii* and could be involved in replicon partitioning. *Mol Microbiol*. 1995; 17:85-93.
17. Mojica FJ, Díez-Villaseñor C, Soria E, Juez G. Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria. *Mol Microbiol*. 2000; 36:244-6.
18. Jansen R, Embden JD, Gastra W, Schouls LM. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Mol Microbiol*. 2002; 43:1565-75.
19. Mojica FJ, Díez-Villaseñor C, García-Martínez J, Soria E. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *J Mol Evol*. 2005; 60:174-82.
20. Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, Romero DA, Horvath P. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*. 2007; 315:1709-12.
21. Mojica FJ, Díez-Villaseñor C, García-Martínez J, Almendros C. Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence



- system. *Microbiology* 2009; 155:733-40.
22. Bolotin A, Quinquis B, Sorokin A, Ehrlich SD. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology*. 2005; 151:2551-61.
 23. Oliveros JC, Franch M, Tabas-Madrid D, San-León D, Montoliu L, Cubas P, Pazos F. Breaking-Cas-interactive design of guide RNAs for CRISPR-Cas experiments for ENSEMBL genomes. *Nucleic Acids Res.* 2016; 44:W267-71.
 24. Torres-Perez R, Garcia-Martin JA, Montoliu L, Oliveros JC, Pazos F. We-Review: CRISPR Tools-Live Repository of Computational Tools for Assisting CRISPR/Cas Experiments. *Bioengineering (Basel)* 2019; 6:63.
 25. Marraffini LA, Sontheimer EJ. CRISPR interference limits horizontal gene transfer in staphylococci by targeting DNA. *Science* 2008; 322:1843-5.
 26. Wiedenheft B, Zhou K, Jinek M, Coyle SM, Ma W, Doudna JA. Structural basis for DNase activity of a conserved protein implicated in CRISPR-mediated genome defense. *Structure* 2009; 17:904-12.
 27. Haurwitz RE, Jinek M, Wiedenheft B, Zhou K, Doudna JA. Sequence- and structure-specific RNA processing by a CRISPR endonuclease. *Science* 2010; 329:1355-8.
 28. Garneau JE, Dupuis MÈ, Villion M, Romero DA, Barrangou R, Boyaval P, Fremaux C, Horvath P, Magadán AH, Moineau S. The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature* 2010; 468:67-71.
 29. Sapranaukas R, Gasiunas G, Fremaux C, Barrangou R, Horvath P, Siksnys V. The *Streptococcus thermophilus* CRISPR/Cas system provides immunity in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* 2011; 39:9275-82.
 30. Gasiunas G, Barrangou R, Horvath P, Siksnys V. Cas9-crRNA ribonuclease complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012; 109:E2579-86.
 31. Josa S, Seruggia D, Fernández A, Montoliu L. Concepts and tools for gene editing. *Reprod Fertil Dev.* 2016; 29:1-7.
 32. Fernández A, Josa S, Montoliu L. A history of genome editing in mammals. *Mamm. Genome.* 2017; 28:237-46.
 33. Jinek M, East A, Cheng A, Lin S, Ma E, Doudna J. RNA-programmed genome editing in human cells. *Elife* 2013; 2:e00471.
 34. Wang H, Yang H, Shivalila CS, Dawlaty MM, Cheng AW, Zhang F, Jaenisch R. One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell* 2013; 153:910-8.
 35. Mok BY, de Moraes MH, Zeng J, Bosch DE, Kotrys AV, Raguram A, Hsu F, Radey MC, Peterson SB, Mootha VK, Mougous JD, Liu DR. A bacterial cytidine deaminase toxin enables CRISPR-free mitochondrial base editing. *Nature* 2020; 583:631-37.
 36. Doudna JA. The promise and challenge of therapeutic genome editing. *Nature* 2020; 578:229-36.
 37. Anzalone AV, Koblan LW, Liu DR. Genome editing with CRISPR-Cas nucleases, base editors, transposases and prime editors. *Nat Biotechnol.* 2020; 38:824-44.
 38. Montoliu L. La modificación genética dirigida en ratones es premiada con el Nobel de Fisiología o Medicina de 2007. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia* 2008; 4:81-99.
 39. Seruggia D, Fernández A, Cantero M, Pelczar P, Montoliu L. Functional validation of mouse tyrosinase non-coding regulatory DNA elements by CRISPR-Cas9-mediated mutagenesis. *Nucleic Acids Res.* 2015; 43:4855-67.
 40. Seruggia D, Fernández A, Cantero M, Fernández-Miñán A, Gomez-Skarmeta JL, Pelczar P, Montoliu L. Boundary sequences flanking the mouse tyrosinase locus ensure faithful pattern of gene expression. *Sci Rep.* 2020; 10:15494.
 41. Seruggia D, Josa S, Fernández A, Montoliu L. The structure and function of the mouse tyrosinase locus. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2020 Oct 23. doi: 10.1111/pcmr.12942.
 42. Lau MT, Manion J, Littleboy JB, Oyston L, Khuong TM, Wang QP, Nguyen DT, Hesselton D, Seymour JE, Neely GG. Molecular dissection of box jellyfish venom cytotoxicity highlights an effective venom antidote. *Nat Commun.* 2019; 10:1655.
 43. Burkard C, Opriessnig T, Mileham AJ, Stadejek T, Ait-Ali T, Lillico SG, Whitelaw CBA, Archibald AL. Pigs Lacking the Scavenger Receptor Cysteine-Rich Domain 5 of CD163 Are Resistant to Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus 1 Infection. *J Virol.* 2018; 92:e00415-18.
 44. Yang L, Güell M, Niu D, George H, Lesha E, Grishin D, Aach J, Shrock E, Xu W, Poci J, Cortazio R, Wilkinson RA, Fishman JA, Church G. Genome-wide inactivation of porcine endogenous retroviruses (PERVs). *Science* 2015; 350:1101-4.
 45. Niu D, Wei HJ, Lin L, George H, Wang T, Lee IH, Zhao HY, Wang Y, Kan Y, Shrock E, Lesha E, Wang G, Luo Y, Qing Y, Jiao D, Zhao H, Zhou X, Wang S, Wei H, Güell M, Church GM, Yang L. Inactivation of porcine endogenous retrovirus in pigs using CRISPR-Cas9. *Science* 2017; 357:1303-7.
 46. Zsögön A, Čermák T, Naves ER, Notini MM, Edel KH, Weinl S, Freschi L, Voytas DF, Kudla J, Peres LEP. De novo domestication of wild tomato using genome editing. *Nat Biotechnol.* 2018 Oct 1. doi: 10.1038/nbt.4272.
 47. Sánchez-León S, Gil-Humanes J, Ozuna CV, Giménez MJ, Sousa C, Voytas DF, Barro F. Low-gluten, nontransgenic wheat engineered with CRISPR/Cas9. *Plant Biotechnol J.* 2018; 16:902-10.
 48. Gao H, Gadlage MJ, Lafitte HR, Lenderts B, Yang M, Schroder M, Farrell J, Snopek K, Peterson D, Feigenbutz L, Jones S, St Clair G, Rahe M, Sanyour-Doyel N, Peng C, Wang L, Young JK, Beatty M, Dahlke B, Hazebroek J, Greene TW, Cigan AM, Chilcoat ND, Meeley RB. Superior field performance of waxy corn engineered using CRISPR-Cas9. *Nat Biotechnol.* 2020; 38:579-81.



49. Kyrou K, Hammond AM, Galizi R, Kranjc N, Burt A, Beaghton AK, Nolan T, Crisanti A. A CRISPR-Cas9 gene drive targeting doublesex causes complete population suppression in caged *Anopheles gambiae* mosquitoes. *Nat Biotechnol.* 2018; 36:1062-6.
50. Harms DW, Quadros RM, Seruggia D, Ohtsuka M, Takahashi G, Montoliu L, Gurumurthy CB. Mouse Genome Editing Using the CRISPR/Cas System. *Curr Protoc Hum Genet.* 2014 Oct 1;83:15.7.1-27.
51. Muñoz-Santos D, Montoliu L, Fernández A. Generation of Genetically Modified Mice Using CRISPR/Cas9. *Methods Mol Biol.* 2020; 2110:129-38.
52. Fernández A, Morín M, Muñoz-Santos D, Josa S, Montero A, Rubio-Fernández M, Cantero M, Fernández J, Del Hierro MJ, Castrillo M, Moreno-Pelayo MÁ, Montoliu L. Simple Protocol for Generating and Genotyping Genome-Edited Mice With CRISPR-Cas9 Reagents. *Curr Protoc Mouse Biol.* 2020 Mar;10(1):e69.
53. Chneiweiss H, Hirsch F, Montoliu L, Müller AM, Fenet S, Abecassis M, Merchant J, Baertschi B, Botbol-Baum M, Houghton JA, Kritikos M, Mifsud J, Bartnik E, Rath J, Druml C, Friedrich B, Carvalho AS, Lanzerath D, Saint-Raymond A. Fostering responsible research with genome editing technologies: a European perspective. *Transgenic Res.* 2017; 26:709-13.
54. Montoliu L, Merchant J, Hirsch F, Abecassis M, Jouannet P, Baertschi B, Sarrauste de Menthiera C, Chneiweiss H. ARRIGE Arrives: Toward the Responsible Use of Genome Editing. *CRISPR J.* 2018; 1:128-9.
55. Hirsch F, Lemaitre C, Chneiweiss H, Montoliu L. Genome Editing: Promoting Responsible Research. *Pharmaceut Med.* 2019; 33:187-91.
56. Maeder ML, Stefanidakis M, Wilson CJ, Baral R, Barrera LA, Bounoutas GS, Bumcrot D, Chao H, Ciulla DM, DaSilva JA, Dass A, Dhanapal V, Fennell TJ, Friedland AE, Giannoukos G, Gloskowski SW, Glucksmann A, Gotta GM, Jayaram H, Haskett SJ, Hopkins B, Horng JE, Joshi S, Marco E, Mevani R, Reyon D, Ta T, Tabbaa DG, Samuelsson SJ, Shen S, Skor MN, Stetkiewicz P, Wang T, Yudkoff C, Myer VE, Albright CF, Jiang H. Development of a gene-editing approach to restore vision loss in Leber congenital amaurosis type 10. *Nat Med.* 2019; 25:229-33.
57. Stadtmayer EA, Fraietta JA, Davis MM, Cohen AD, Weber KL, Lancaster E, Mangan PA, Kulikovskaya I, Gupta M, Chen F, Tian L, Gonzalez VE, Xu J, Jung IY, Melenhorst JJ, Plesa G, Shea J, Matlawski T, Cervini A, Gaymon AL, Desjardins S, Lamontagne A, Salas-McKee J, Fesnak A, Siegel DL, Levine BL, Jadowsky JK, Young RM, Chew A, Hwang WT, Hexner EO, Carreno BM, Nobles CL, Bushman FD, Parker KR, Qi Y, Satpathy AT, Chang HY, Zhao Y, Lacey SF, June CH. CRISPR-engineered T cells in patients with refractory cancer. *Science* 2020; 367:eaba7365.
58. Haydar Frangoul, M.D., David Altshuler, M.D., Ph.D., M. Domenica Cappellini, M.D., Yi-Shan Chen, Ph.D., Jennifer Domm, M.D., Brenda K. Eustace, Ph.D., Juergen Foell, M.D., Josu de la Fuente, M.D., Ph.D., Stephan Grupp, M.D., Ph.D., Rupert Handgretinger, M.D., Tony W. Ho, M.D., Antonis Kattamis, M.D., Andrew Kernytzky, Ph.D., Julie Lekstrom-Himes, M.D., Amanda M. Li, M.D., Franco Locatelli, M.D., Markus Y. Mapara, M.D., Ph.D., Mariane de Montalembert, M.D., Damiano Rondelli, M.D., Akshay Sharma, M.B., B.S., Sujit Sheth, M.D., Sandeep Soni, M.D., Martin H. Steinberg, M.D., Donna Wall, M.D., Angela Yen, Ph.D., and Selim Corbacioglu, M.D. CRISPR-Cas9 Gene Editing for Sickle Cell Disease and β -Thalassemia. *New England Journal of Medicine*, December 5, 2020, DOI: 10.1056/NEJMoa2031054
60. Broughton JP, Deng X, Yu G, Fasching CL, Servellita V, Singh J, Miao X, Streithorst JA, Granados A, Sotomayor-Gonzalez A, Zorn K, Gopez A, Hsu E, Gu W, Miller S, Pan CY, Guevara H, Wadford DA, Chen JS, Chiu CY. CRISPR-Cas12-based detection of SARS-CoV-2. *Nat Biotechnol.* 2020; 38:870-4.
61. Joung J, Latha A, Saito M, Kim NG, Woolley AE, Segel M, Barretto RPJ, Ranu A, Macrae RK, Faure G, Ioannidi EI, Krajeski RN, Bruneau R, Huang MW, Yu XG, Li JZ, Walker BD, Hung DT, Greninger AL, Jerome KR, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Zhang F. Detection of SARS-CoV-2 with SHERLOCK One-Pot Testing. *N Engl J Med.* 2020; 383:1492-4.
62. Fozouni P, Son S, Díaz de León Derby M, Knott GJ, Gray CN, D'Ambrosio MV, Zhao C, Switz NA, Kumar GR, Stephens SI, Boehm D, Tsou CL, Shu J, Bhuiya A, Armstrong M, Harris AR, Chen PY, Osterloh JM, Meyer-Franke A, Joehnk B, Walcott K, Sil A, Langelier C, Pollard KS, Crawford ED, Puschnik AS, Phelps M, Kistler A, DeRisi JL, Doudna JA, Fletcher DA, Ott M. Amplification-free detection of SARS-CoV-2 with CRISPR-Cas13a and mobile phone microscopy. *Cell* 2020; S0092-8674(20)31623-8. doi: 10.1016/j.cell.2020.12.001.
63. Abbott TR, Dhamdhare G, Liu Y, Lin X, Goudy L, Zeng L, Chemparathy A, Chmura S, Heaton NS, Debs R, Pande T, Endy D, La Russa MF, Lewis DB, Qi LS. Development of CRISPR as an Antiviral Strategy to Combat SARS-CoV-2 and Influenza. *Cell* 2020; 181:865-76.

Agradecimientos

Quiero agradecer y dedicar este artículo a Francisco Juan Martínez Mojica, por todo su trabajo de investigación básica llevado a cabo desde la Universidad de Alicante, que permitió avanzar a otros muchos investigadores y posibilitó la aparición de estas herramientas CRISPR de edición genética que hoy todos disfrutamos.

Si desea citar nuestro artículo:

Juan Ramón Lacadena, Pablo Gastaminza, Lluís Montoliu

Sesión científica celebrada el 26 de noviembre de 2020 para conmemorar los premios Nobel en fisiología o medicina y en química 2020

An. Real Acad. Farm. [Internet].

An. Real Acad. Farm. Vol. 86. Nº 4 (2020) · pp. 287 - 310

DOI: <http://>