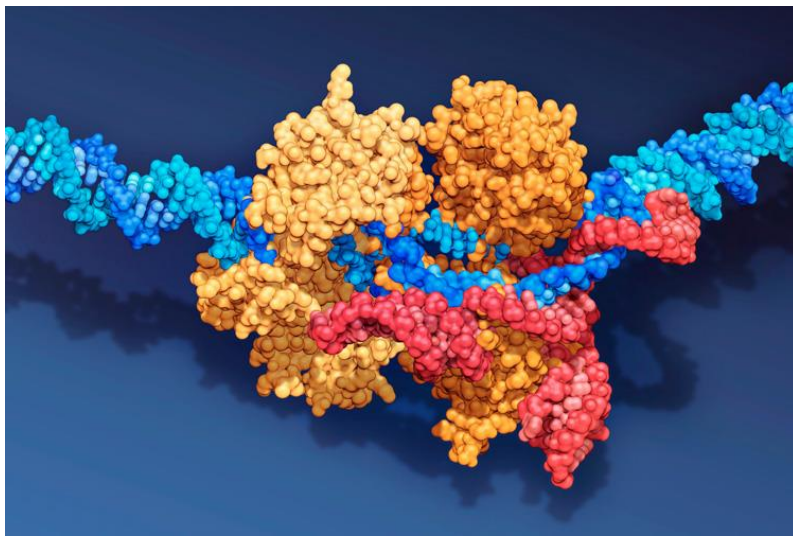


LA TÈCNICA CRISPR, UNA SOLUCIÓ PER A MALALTIES ORFES



Fet per: Andrés Fernández Real

2n BATX B

Tutoritzat per Cristina Antón

IES Anna Gironella de Mundet

ABSTRACT:

Nowadays, the cure of most diseases is known, but there is still a big group to develop: the genetic diseases. The big difficulty lies in the fact that they are caused by an alteration in the DNA, which is almost untouchable by our current technology. Or that is what we thought. During the last decade a new technique has been developed which would allow us to change it and, thus, treat them. Its name is CRISPR technique. It consists of cutting a certain sequence of DNA with the help of a guide RNA and an enzyme named Cas9 and inserting (or not) another sequence. This work presents a theoretical revision about the DNA, the CRISPR technique and other subjects like bioethics. In addition, to exemplify its use as a genetic edition mechanism, it will be carried out a design of an experimental healing treatment through the use of genetic therapy and CRISPR technique for Huntington's Disease.

Keywords: CRISPR technique, genomic edition, DNA, sgRNA, Cas9 enzyme

RESUMEN:

Hoy en día, se conoce la cura para la mayoría de enfermedades, pero aún queda un gran grupo por desarrollar: las enfermedades genéticas. La gran dificultad es que son causadas por una alteración en el ADN, que es casi intocable por la tecnología actual. O eso pensábamos. En la última década se ha desarrollado una técnica que podría modificarlo y, por tanto, curarlas. Se llama técnica CRISPR. Esta técnica consiste en recortar una secuencia de ADN concreta con ayuda de ARN guía y de una enzima llamada Cas9 e insertar (o no) una otra. En este trabajo se presenta una revisión teórica sobre el ADN, la técnica CRISPR y otros asuntos como la bioética. Además de ejemplificar su uso como mecanismo de edición genómica, se llevará a cabo el diseño experimental de un tratamiento curativo para la Enfermedad de Huntington mediante el uso de la terapia génica y la técnica CRISPR

Palabras clave: técnica CRISPR, edición genómica, ADN, sgARN, enzima Cas9

RESUM:

Avui dia, es coneix la cura per a la majoria de les malalties, però encara en queda un gran grup per desenvolupar: les malalties genètiques. La gran dificultat és que són causades per una alteració a l'ADN, que es gairebé intocable per a la tecnologia actual. O això pensàvem. En l'última dècada, s'ha desenvolupat una tècnica que podria modificar-lo i, per tant, curar-les. S'anomena tècnica CRISPR. Aquesta tècnica consisteix a retallar una seqüència d'ADN concreta amb l'ajut d'ARN guia i d'un enzim anomenat Cas9 i inserir-n'hi (o no) una altra. En aquest treball es presenta una revisió teòrica sobre l'ADN, la tècnica CRISPR i altres assumptes com la bioètica. A més d'exemplificar el seu ús com a mecanisme d'edició genètica, es durà a terme el disseny d'un tractament curatiu per a la Malaltia de Huntington mitjançant l'ús de la teràpia gènica i la tècnica CRISPR

Paraules clau: Tècnica CRISPR, edició genòmica, ADN, sgARN, enzim Cas9

GLOSSARI:

- AAV: Virus adeno-associat (**A**deno-**a**ssociated **v**irus)
- bp: parell de bases (base pair)
- Cas: gens o proteïnes associats a CRISPR (**C**RISPR-**a**ssociated)
- CRISPR: agrupació de repeticions palindròmiques curtes regularment interespaiades (**cl**ustered **re**gularly **i**nterspaced **s**hort **p**alindromic **r**epeats)
- CRISPR-Cas: : agrupació de repeticions palindròmiques curtes regularment interespaiades associades a nucleases Cas.
- crRNA: RNA transcrit de CRISPR (**C**RISPR **R**NA)
- DSB: doble tall en la cadena (**d**ouble-**s**trand **b**reak)
- gRNA scaffold sequence: La seqüència dins del gRNA que s'encarrega de l'enllaç Cas9, NO inclou la seqüència d'espaiador /diana de 20 bp que s'utilitza per guiar Cas9 a l'ADN objectiu
- gRNA targeting sequence: Els 20 nucleòtids que precedeixen la seqüència PAM en l'ADN genòmic. Aquesta seqüència es clona en un plasmidi d'expressió de gRNA, però NO inclou la seqüència PAM o la seqüència de reforç (scaffold) de gRNA
- HDR: reparació dirigida per homologia (**h**omology **d**irected **r**epeat)
- Intratecal: espai ple de líquid entre les capes primes de teixits que cobreixen el cervell i la medul·la espinal.
- MH: **M**alaltia de **H**untington
- NHEJ: reparació d'unió de extrems no homòlegs (**n**on-**h**omologous **e**nd **j**oining)
- PAM: seqüència curta adjacent al protoespaiador (**p**roto**s**pacer **a**djacent **m**otif)
- PCR: reacció en cadena de la polimerasa (**P**olymerase **C**hain **R**eaction)
- Plasmidi: Element genètic present en els bacteris, que porta gens addicionals als del genoma normal i pot estar lliure en el citoplasma o estar integrat en el cromosoma bacterià.
- *Primers*: cadena simple curta d'ARN o ADN (generalment d'unes 18 a 22 bases) que serveix de punt de partida per a la síntesi d'ADN.
- sgRNA: RNA guia individual (**s**ingle-**g**uide **R**NA)
- TG: teràpia gènica
- tracrRNA: noncoding trans-activating CRISPR-RNA

ÍNDEX

0. INTRODUCCIÓ:.....	1
0.1. METODOLOGIA	3
0.2. OBJECTIUS	3
0.3. HIPÒTESI.....	4
PART I: L'ADN, ERRORS GENÈTICS I TÈCNICA CRISPR	
1. L'ADN I LA SEVA FUNCió.....	6
1.1. L'ADN COM A ÀCID NUCLEIC.....	6
1.2. L'ADN COM A TRANSMISSOR D'INFORMACió	7
1.3. L'ADN COM A SINTETITZADOR DE PROTEÏNES	8
2. ERRORS EN L'ADN	9
2.1. QUÈ ÉS UN ERROR A L'ADN?	9
2.2. COM ES PRODUEIX UN ERROR A L'ADN	9
2.3. TIPUS D'ERRORS DE L'ADN	10
2.4. CONSEQÜÈNCIES DELS ERRORS DE L'ADN	10
2.5. LES REPARACIONS DELS ERRORS	11
3. TÈCNICA CRISPR.....	12
3.1. HISTÒRIA DE LA TÈCNICA CRISPR-Cas9?.....	12
3.2. COM FUNCIONA LA TÈCNICA CRISPR-Cas9?	13
3.3. QUAN ES POT DUR A TERME?.....	14
3.4. APLICACIONS DE LA TÈCNICA CRISPR-Cas9	14
3.5. PROTOCOL	15
3.6. BENEFICIS DE LA TÈCNICA	16
3.7. INCONVENIENTS DE LA TÈCNICA	17
4. BIOÈTICA:	18
4.1. QUÈ ÉS?.....	18
4.2. QUAN I PER QUÈ ACTUA?	18
4.3. TÈCNICA CRISPR vs BIOÈTICA	19
PART II: LA TÈCNICA CRISPR COM A CURA PER A LA MALALTIA DE HUNTINGTON	
0. OBJECTIUS I METODOLOGIA:.....	21
0.1. OBJECTIUS:	21
0.2. METODOLOGIA:	21

1.	LA MALALTIA DE HUNTINGTON	22
1.1.	QUÈ ÉS ?.....	22
1.2.	CAUSES.....	22
1.3.	SÍMPTOMES.....	23
1.4.	DIA A DIA D'UNA PERSONA AFECTADA.....	26
1.5.	PRONÒSTIC I ACTUAL TRACTAMENT	26
2.	LA TÈCNICA CRISPR/Cas9 COM A TERÀPIA GÈNICA	29
2.1.	PER QUÈ UTILITZAR LA TÈCNICA CRISPR/Cas9	29
2.2.	PROPÒSIT DE LA TÈCNICA CRISPR (què ha de fer la tècnica CRISPR)	29
2.3.	COMPONENTS PER A LA TÈCNICA (gRNAs, Cas9, plasmidis, vectors)	30
2.4.	PROCEDIMENT PER AL DISSENY DE gRNAs	31
2.5.	PROCEDIMENT DE L'EXPERIMENTACIÓ/ APLICACIÓ DE LA TÈCNICA.....	32
2.6.	FUNCIONAMENT TÈCNICA CRISPR.....	33
2.7.	TÈCNiques DE VALIDACIÓ	34
2.8.	DISSENY DE PCR ROI <i>PRIMERS</i>	35
3.	MODIFICACIONS GENÈTIQUES: BIOÈTICA I SOCIETAT	37
	RESULTATS	38
R. 1.	ENTREVISTA AL Dr. ESTEBAN MUÑOZ	38
R. 2.	gRNAs.....	38
R. 3.	PCR ROI <i>Primers</i>	40
R. 4.	ENQUESTES	40
R. 5.	ANÀLISI DELS RESULTATS.....	54
	CONCLUSIONS	56
	AGRAÏMENTS	58
	RECOMANACIONS I ANNEXOS.....	59
	REFERÈNCIES, WEBGRAFIA I BIBLIOGRAFIA	72

0. INTRODUCCIÓ:

Al segle XIX, Gregor Mendel, un monjo agustí, va alternar els estudis de teologia amb els de ciències naturals. En el monestir on residia, va aprofitar el seu hort per conèixer com es transmetien els caràcters hereditaris per obtenir una millor collita. Per fer-ho, va realitzar experiències amb pesoleres on hibridava plantes amb diferents caràcters i apuntava tot el que recollia. Malgrat el seu treball, els seus estudis no van ser ben acollits per la comunitat científica del moment i, quan va ser anomenat abat del monestir es va apartar de les seves recerques.¹

Més tard, Friedrich Miescher, un científic suís, va realitzar experiments amb leucòcits que obtenia de vendes quirúrgiques usades. En un d'ells, al 1868, va descobrir una substància que no era proteïna, lípid o glúcid, que contenia grans quantitat de fòsfor. Com que aquesta substància l'havia obtinguda de l'aïllament de nuclis cel·lulars, va anomenar-la *nuclein*. Més tard, va descobrir que aquesta substància era present en els nuclis de totes les cèl·lules.²

No va ser fins a 16 anys després de la mort de Mendel que la seva recerca va entrar en la comunitat científica. Va ser quan, independentment, tres científics més van redescobrir el treball de Mendel i van reportar resultats molts similars als del monjo.

Dos anys més tard, al 1902, Sir Alchibals Edward Garrod va associar per primera vegada les teories de Mendel amb una malaltia humana: l'alcaptonúria, ja que va observar que era una malaltia molt rara que només es transmetia de pares a fills. Va arribar a la conclusió que era una trastorn recessiu.³

En els següents anys, es començaria a estudiar l'herència i la composició del que anomenarien ADN. Més concretament, al 1929, la composició de l'ADN va ser demostrada per Phoebus Levene: l'ADN contenia un sucre de 5 carbonis (desoxiribosa), un grup fosfat i 4 bases nitrogenades diferents.

Al 1952, una de les poques dones de l'època que va poder ser científica va fer un gran avenç en la ciència, Rosalind Franklin. Després d'obtenir un doctorat de química física a la Universitat de Cambridge i treballar al Laboratori Central de Serveis Químics a París aprenent tècniques de difracció dels rajos X, va tornar a Londres on va treballar en un laboratori del *King's College* on el seu paper era establir i millorar la unitat de cristal·lografia. En aquesta etapa, juntament amb Maurice Williams, va poder produir dos conjunts de fotografia d'alta resolució de fibres d'ADN. Una d'aquestes fotografies, la 51, és coneguda avui dia perquè va revelar, de manera inconfusible, l'estructura helicoidal de la molècula d'ADN.

Després d'aquests successos, els científics James Watson i Francis Crick van resoldre, observant i contrastant els resultats d'experiments fets per altres persones (com les fotografies

¹ (Molina, n.d.)

² (Alemañ, 2015)

³ (DNA Worldwide, n.d.)

de Rosalind Franklin), l'enigma de l'estructura de l'ADN. A continuació, van publicar el famós article de la revista Nature i anys més tard, juntament amb Williams, van ser recompensats amb el Premi Nobel de Fisiologia o Medicina. Tot i que les seves fotografies havien estat fonamentals per a la solució de Watson i Crick, Rosalind Franklin no va ser honorada, ja que només tres científics podien compartir el premi.

Tan aviat com va ser possible, tota la comunitat científica, animada pels resultats de Watson i Crick, va començar a voler investigar sobre l'ADN. Un d'ells, Marshall Nirenberg, competint amb el recent premi Nobel Severo Ochoa, va investigar sobre la codificació de l'ADN fins que, finalment, el 1965, Nirenberg es va convertir en la primera persona en seqüenciar el codi. Tres anys més tard, juntament amb Robert W. Holley i Har Gobind Khorana, va ser recompensat amb el Premi Nobel.

Els anys següents, la genètica va créixer molt ràpidament i per fer-ho, abans, Frederick Sanger, va desenvolupar tècniques ràpides de seqüenciació de l'ADN (fet que va fer que guanyés un segon Premi Nobel de Química).

Ara que ja tenien una tècnica ràpida per seqüenciar ADN, es va començar a aplicar per tal de trobar relacions entre malalties sense cura i gens. D'aquesta manera, el 1983 es va trobar un marcador genètic lligat a una malaltia, la Malaltia de Huntington (que veurem més endavant), al cromosoma 4. Aquest fet la va convertir en la primera malaltia genètica que es va "mapejar" amb polimorfismes d'ADN. No obstant això, el gen no va ser finalment aïllat fins a 1993.

Els següents avenços van ser seqüenciar els genomes que fossin útils per a l'estudi de la biologia. Per aquest motiu, el 1990 va començar el Projecte Genoma Humà que no va acabar fins el 2003.

D'una banda, mentre es seqüenciava el genoma humà, se'n van seqüenciar d'altres. Els mes representatius van ser: el del primer bacteri el 1995 (*Haemophilus influenzae*), el de la mosca de la fruita el 2000 i el del primer mamífer el 2002: un ratolí. D'altra banda, al 1996 es va clonar el primer mamífer a partir d'una cèl·lula adulta: l'ovella Dolly.

Dit això, sembla que ja està tot descobert en l'àmbit de l'ADN, però la ciència necessita avançar i el següent pas, després de conèixer l'ADN i haver clonar un ésser viu, és modificar l'ADN.

I és aquí on es troba la ciència actualment.

Fa uns anys, quan jo estava estudiant biologia, ens van explicar què se sabia de l'ADN i jo, sobretot, vaig parar atenció en què existeix un grup de malalties que es transmeten per l'ADN. Moltes d'aquestes malalties són incurables, ja que l'ADN no es pot modificar i, per tant si una persona ha rebut la malaltia dels seus pares i s'expressa, no es pot fer res més que un tractament per disminuir-ne els símptomes.

Després d'un temps pensant, vaig tenir la idea (evidentment, no vaig ser el primer del món) que, en el cas que la malaltia estigui present sempre a l'ADN dels gàmetes paterns (espermatozoide i òvul), podria haver-hi la possibilitat de modificar l'ADN de l'embrió, fent que l'organisme no patís la malaltia

Quan vaig haver de presentar el tema del Treball de Recerca a la tutora, em va dir que això era possible (però no era legal fer embrions a la carta) i que es podia fer mitjançant una tècnica anomenada CRISPR-Cas9, que era utilitzada avui dia i era molt més fàcil i barat que la resta de mètodes de modificació genètica coneguts.

Malgrat això, aquesta tècnica també es pot utilitzar com a mètode de teràpia gènica. Com que això sí que és legal actualment, vaig decidir-me a fer el Treball de Recerca sobre **la Tècnica CRISPR com a solució de malalties orfes**. En el meu cas, em vaig decidir a intentar trobar una "cura" a la Malaltia de Huntington, la primera que va ser mapejada, mitjançant l'ús de la tècnica com a mètode de teràpia gènica.

0.1. METODOLOGIA

Per fer aquest treball, he utilitzat una metodologia basada en el mètode científic:

- 1) Recerca web/bibliogràfica sobre l'ADN, la tècnica CRISPR, les malalties gèniques (en concret la malaltia de Huntington) i la bioètica.
- 2) Establiment d'objectius i d'una hipòtesi.
- 3) Estada pràctica al Parc Científic de Barcelona sota la tutoria de la Dra. Erika López pel disseny experimental.
- 4) Entrevista al Dr. Esteban Muñoz especialista en la malaltia de Huntington.
- 5) Enquestes a través de Google Forms a la població, per analitzar l'opinió de la societat respecte de les modificacions genètiques.
- 6) Anàlisi de resultats i elaboració de conclusions.

0.2. OBJECTIUS

Donada la metodologia, els objectius plantejats que han de ser assolits els he dividit en tres grups: els objectius acadèmics, els objectius teòrics i els objectius pràctics.

Els objectius acadèmics són aquells que vull assolir en relació a l'elaboració d'un treball o estudi en general. Són els següents:

- Aprendre l'estructura i l'estil d'un treball acadèmic i saber aplicar-la.
- Conèixer les eines d'obtenció d'informació: saber utilitzar els cercadors de llibres de biblioteques universitàries, aprendre a utilitzar buscadors d'articles com *Google Scholar*, *Pubmed* o *SciELO*, ...
- Utilitzar les normes de l'APA (*American Psychological Association*) per tal de citar tota la informació que no sigui de la meua autoria amb l'ajut del gestor de cites i referències *Mendeley*.
- Millorar en la comprensió d'articles científics i en la seva interpretació

Els objectius teòrics són aquells que tenen a veure amb la part "teòrica" d'aquest treball. Són els següents:

- Dominar el coneixement de l'estructura de l'ADN i el seu funcionament.
- Aprendre com es produeixen els errors genètics i com solucionar-los.
- Conèixer i saber interpretar la tècnica CRISPR/Cas9.
- Conèixer el funcionament de la tècnica CRISPR/Cas9.
- Aprendre què és la bioètica i la seva relació amb la tècnica CRISPR/Cas9.

Els objectius pràctics seran descrits més endavant.

0.3. HIPÒTESI

Després d'haver realitzat el primer punt de la metodologia, he pogut desenvolupar una hipòtesi principal i altres hipòtesis secundàries.

La hipòtesi d'aquest treball és: **La tècnica CRISPR/Cas9 pot curar la malaltia de Huntington.**

Les hipòtesis secundàries que vull comprovar són:

- Les mutacions de l'ADN es donen espontàniament sense cap causa.
- Els errors a l'ADN es poden corregir.
- La potència de les tècniques de modificació genètiques no segueix els principis de la bioètica.

PART I: L'ADN, ERRORS GENÈTICS I TÈCNICA
CRISPR

1. L'ADN I LA SEVA FUNCIO

1.1. L'ADN COM A ÀCID NUCLEIC

L'ADN és el nom amb què es coneix popularment una macromolècula anomenada àcid desoxiribonucleic. "Aquesta molècula forma part d'un grup que s'anomena àcid nucleic. Va rebre aquest nom perquè en un principi, van ser localitzats dins del nucli cel·lular" (Gálvez Sánchez, 2009). Són macromolècules, polímers formats per la repetició de molècules més petites (monòmers) anomenats nucleòtids (Figura 1). Aquests nucleòtids, units per enllaços fosfodièster, estan formats per 3 molècules més petites: un àcid fosfòric, encarregat d'enllaçar els monòmers, un glúcid (sucre) de cinc carbonis i una base nitrogenada. Depenent del glúcid que forma el nucleòtid, podem distingir dos tipus d'àcid nucleic: l'àcid ribonucleic (ARN), format amb una ribosa, o l'àcid desoxiribonucleic (ADN), format amb una desoxiribosa.

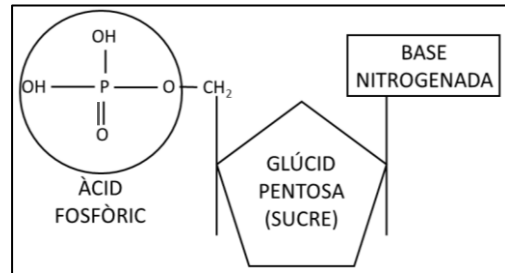


Figura 1 Estructura d'un nucleòtid Esquema propi. Idea extreta de: http://morfofitologia.blogspot.com/2008/07/tema-15-nucleotidos-y-acidos-nucleicos_26.html

"Els àcids nucleics són els encarregats de l'herència i, per tant, participen en processos mitjançant els quals la informació genètica s'emmagatzema, replica i transcriu. Encara que aquesta no és l'única funció dels nucleòtids. Hi ha derivats dels nucleòtids que s'encarreguen també de transferir energia a les cèl·lules (ATP, ADP, ...), transferir electrons en reaccions d'oxidoreducció (NADH, NAD⁺, NADP⁺, ...) o fer de missatger d'hormones dins la cèl·lula (AMPc)." (Gálvez Sánchez, 2009)

En poques paraules, els àcids nucleics són polinucleòtids, és a dir, llargues cadenes formades per nucleòtids que es diferencien segons la seva base nitrogenada.

"Les bases nitrogenades (Figura 2) són compostos orgànics cíclics que inclouen dos o més àtoms de nitrogen (d'aquí el seu nom). Principalment, es divideixen en dos grups tot i que, existeixen altres grups amb altres bases.

Aquests són les bases puríniques i pirimidíniques. L'adenina (A) i la guanina (G) són puríniques tanmateix, la timina (T), la citosina (C) i l'uracil (U) són pirimidíniques.

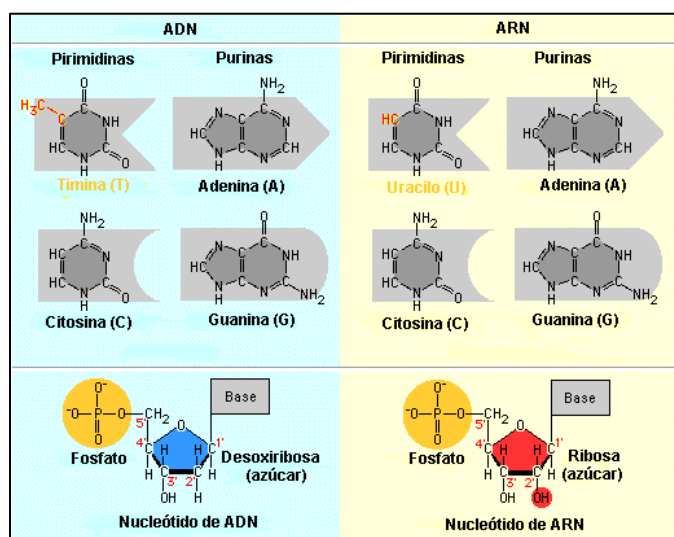
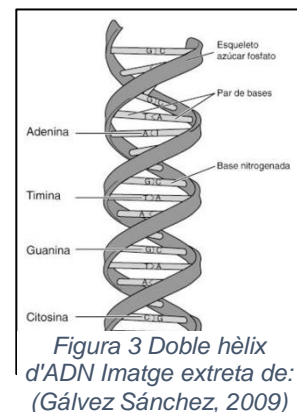


Figura 2 Bases nitrogenades. Imatge extreta de: (Gálvez Sánchez, 2009)

Les bases A, G, T i C es troben a l'ADN mentre que a l'ARN no hi trobem T però sí U." (Gálvez Sánchez, 2009)

"Un punt fonamental és que les bases són complementàries entre sí. Això significa que formen parelles que s'uneixen per formar la doble cadena d'ADN. L'adenina i la timina (A=T) són complementàries igual que la guanina i la citosina (G=C)" (Gálvez Sánchez, 2009). Són exclusivament complementàries d'aquesta manera, ja que s'uneixen els hidrògens de les bases per ponts d'hidrogen. En el cas de l'adenina i la timina, les seves bases només tenen dos hidrògens lliures que s'uneixen. En canvi, la guanina i la citosina, tenen tres hidrògens lliures que s'uneixen entre ells. Això fa que qualsevol altra combinació sigui impossible. Donat que en l'ARN no existeix la timina, la complementarietat s'estableix entre adenina i uracil (A=U).

"Gràcies als enllaços de pont d'hidrogen entre les bases de dues cadenes, es forma la doble hèlix d'ADN (Figura 3), el model descrit per Watson i Crick. Aquest model està format per dues cadenes de nucleòtids. Aquestes dues cadenes se situen de forma antiparal·lela, és a dir, una orientada en sentit 5'-3' i l'altra de 3'-5'. Les dues cadenes estan enrotllades sobre sí mateixes al voltant d'un eix imaginari, que gira en contra de les agulles d'un rellotge." (Gálvez Sánchez, 2009)



1.2. L'ADN COM A TRANSMISSOR D'INFORMACIÓ

L'ADN conté la informació genètica utilitzada pel desenvolupament i el funcionament dels organismes vius i d'alguns virus, sent el responsable de la seva transmissió hereditària.

Podem comparar aquest àcid nucleic amb un llibre, on hi ha escrites les instruccions de tot un ésser viu amb la petita diferència que està escrit amb només quatre lletres i amb una línia doble, per duplicat seguint un codi determinat (la complementarietat de bases).

Aquest llibre necessita d'un medi que sàpiga llegir les instruccions que s'hi troben escrites, un tros del codi genètic pot contenir la fórmula per fer una proteïna que doni una característica determinada a un ésser viu o que activi una reacció a l'organisme (enzim).

La transmissió hereditària es fa en la duplicació cel·lular on una cèl·lula duplica el seu ADN, s'invagina i es divideix en dos. Aquesta DUPLICACIÓ del DNA es produeix perquè existeixen uns enzims, anomenats DNA polimerases, que sintetitzen cadenes complementàries a les existents, utilitzant aquestes com a patrons. D'aquest procés, obtenim dos còpies d'una cadena d'ADN que seran cobertes per una membrana nuclear cascuna i es situarà cada nucli en una de les meitats de la cèl·lula que es dividirà en dues. Aquestes cèl·lules filles tindran exactament la mateixa informació genètica que la cèl·lula mare.

1.3. L'ADN COM A SINTETITZADOR DE PROTEÏNES

Tal com s'ha dit a l'apartat anterior, l'ADN transmet l'herència a partir de la síntesi de proteïnes. Però, el camí d'ADN a proteïna és una mica complicat ja que es veu implicat l'altre àcid nucleic: l'ARN.

Per a aquest procés, la cèl·lula necessita uns complexos macromoleculars anomenats ribosomes que s'encarreguen de llegir les cadenes d'ADN. Aquestes estructures són formades per proteïnes i ARN ribosòmic (tenen dues subunitats que estan separades al citoplasma). Per a què l'ADN pugui ser llegit pel ribosoma (l'ADN no pot sortir del nucli i el ribosoma no hi pot entrar), l'ADN es serveix d'un intermediari per enviar les seves instruccions: el RNA missatger. Aquest ARN s'ha de sintetitzar i aquest procés de síntesi, és anomenat TRANSCRIPCIÓ

Tots els tipus d'ARN s'obtenen d'una transcripció de l'ADN. Aquesta transcripció, és molt semblant a una duplicació: un enzim, anomenat ARN polimerasa, forma enllaços fosfodièster entre els nucleòtids per sintetitzar ARN a partir d'una seqüència d'ADN que serveix com a patró. En la formació dels ribosomes, l'ARNr s'uneix amb proteïnes al nuclèol.

L'ARNm que s'ha transcrit pel principi de complementarietat de bases [codó(ARNm)-anticodó(ARNt)], surt del nucli i es fixa als ribosomes (s'uneixen les dues subunitats i l'ARNm passa "entre les dues"). Als ribosomes, un altre tipus d'ARN, l'ARN de transferència, s'enganxa a l'ARNm per complementarietat de bases de tres en tres. Aquest ARNt rep aquest nom perquè transporta un aminoàcid. L'ARNm va passant pel ribosoma i l'ARNt va portant aminoàcids que es van enllaçant entre ells formant proteïnes. En aquest procés se l'ha anomenat: TRADUCCIÓ.

La traducció sempre comença amb un codó AUG (que es tradueix com l'aminoàcid metionina) i acaba amb tres possibilitats de codons que no es tradueixen en cap aminoàcid i per tant, s'acaba el procés de traducció (UAA, UAG, o AGA).

Quan s'acaba la traducció, les subunitats dels ribosomes es separen, l'ARNm es desfà i l'ARNt agafa un aminoàcid (cada ARNt és especialista per a un aminoàcid en concret. P. ex. un ARNt d'anticodó UAC, sempre portarà metionina i mai cap altre aminoàcid).

Per aquest motiu, si a l'ADN hi ha un error, l'organisme farà una proteïna diferent que no tindrà la mateixa funció que la que es produiria si l'ADN no estigués danyat.

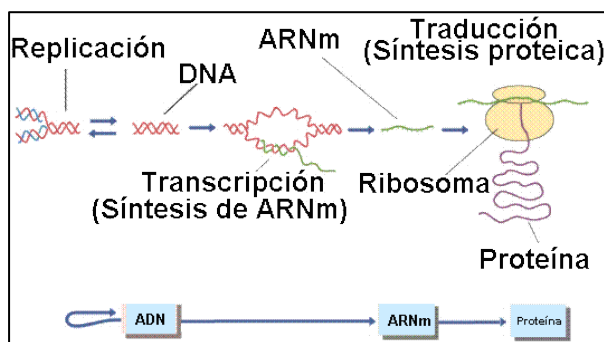


Figura 4 Dogma central de la Biologia. Extret de (Raisman & Gonzalez, n.d.)

2. ERRORS EN L'ADN

2.1. QUÈ ÉS UN ERROR A L'ADN?

L'ADN està exposat a una multitud d'agents que poden produir-li danys. Aquests danys s'anomenen mutacions i poden produir canvis permanents a la seqüència d'ADN. Constantment, es formen noves cèl·lules i, per tant, es replica l'ADN. En aquestes replicacions es produeixen errors, a les nostres cèl·lules, anomenats mutacions. No obstant això, en la gran majoria dels casos, les mutacions no causen cap canvi significatiu, ja que les cèl·lules solen detectar i reparar els error mitjançant mecanismes de correcció i reparació de l'ADN.

A més a més, si un error no es pot reparar, la cèl·lula inicia un mecanisme anomenat apoptosi (mort cel·lular) per tal d'evitar heretar l'ADN defectuós.

2.2. COM ES PRODUEIX UN ERROR A L'ADN

Els error de l'ADN, o mutacions, es poden produir de dues formes: naturalment (anomenats endògens perquè es formen dins la cèl·lula en sí) o provocats per un agent extern, anomenats mutagènics.

Moltes vegades, les mutacions es causen de manera natural, espontàniament, com error en la divisió cel·lular, en la replicació o de manera fortuïta. En la replicació hi ha errors, ja que l'ADN, quan es replica, depèn de l'enzim que uneix els nucleòtids: la DNA polimerasa. Aquest enzim segueix una de les cadenes i la copia seguint la complementarietat de bases. Encara que l'acció d'aquest enzim sol ser correcta, de vegades insereix un nucleòtid en lloc del correcte.

També, pot ser que l'error no sigui a nivell d'una o varies bases sinó que sigui a nivell cromosòmic. En aquests casos, l'error es produeix al moment de fer la divisió cel·lular, quan els cromosomes no s'han repartit per igual a les dues cèl·lules.

Tornant als errors del genoma en sí, hi ha factors que danyen l'ADN espontàniament. El més conegut és les altes temperatures. En aquesta temperatura es perden milers de bases espontàniament, deixant llocs apurínics i apirimidínics incapaços de determinar la inserció correcta de las bases en la cadena complementària.

En canvi, hi ha altres danys endògens molt importants com la modificació de bases per metilacions, el canvi entre bases nitrogenades per desaminació i el dany oxidatiu en l'ADN. (*Per més informació, veure RECOMANACIONS/ANNEXOS*).

Per altra banda, els danys de l'ADN també poden ser causats per factors externs, és a dir, ser danys exògens. Aquests es poden classificar en físics i químics.

Els principals agents externs físics que danyen l'ADN són les radiacions ionitzants i les radiacions ultraviolades. Les radiacions ionitzants són les conegudes com rajos X i rajos γ .

“Els rajos esmentats generen radicals lliures al citoplasma cel·lular, que poden danyar l'ADN. En canvi, amb les radiacions ultraviolades (UV), malgrat que la capa d'ozó n'absorbeix la major part, els espectres residuals d'aquesta radiació poden fer que augmenti la probabilitat que la DNA polimerasa, a la replicació de l'ADN, insereixi un nucleòtid incorrecte”.(Monsalve Carmona, 2014). *(Per més informació, veure RECOMANACIONS/ANNEXOS)*.

Per una altra banda, els principals agents exògens químics són agents alquilants, agents desaminitzants, agents utilitzats pel tractament del càncer, anàlegs de bases i agents que s'intercalen. *(Per més informació, veure RECOMANACIONS/ANNEXOS)*

Per acabar amb els agents externs, cal mencionar que existeixen agents biològics capaços de modificar l'ADN de l'ésser viu que l'allotja, com per exemple: virus, bacteris o fongs. Són exemples els transposons (fragments autònoms d'ADN).

2.3. TIPUS D'ERRORS DE L'ADN

Podem dividir els errors o mutacions de diverses maneres però, la més popular ve determinada segons la quantitat de material afectat. D'aquesta manera, les mutacions es classifiquen en: gèniques, cromosòmiques o genòmiques.

En primer lloc, les mutacions gèniques són aquelles que només afecten un gen. Aquestes es poden produir per mutacions espontànies o poden ser causades per algun factor extern.

En segon lloc, les mutacions de tipus cromosòmics són aquelles que afecten una part del cromosoma, és a dir, que poden afectar diversos gens. Normalment, es causen per una mala replicació de l'ADN o bé per algun factor extern

Finalment, les mutacions genòmiques són aquelles que afecten cromosomes sencers (per excés o per defecte de cromosomes). Són causades en el moment de la formació de l'organisme, quan un dels gàmetes sexuals no porta el nombre de cromosomes correctes. *(Per més informació, veure RECOMANACIONS/ANNEXOS)*.

2.4. CONSEQÜÈNCIES DELS ERRORS DE L'ADN

Depenent de l'error que hi hagi dins l'ADN, l'organisme pot experimentar diferents conseqüències.

En el cas que l'error sigui de tipus gènic, pot ser des d'un error d'una base fins a un gen sencer. En cas d'una o poques bases, si la cèl·lula no el corregeix, el més segur és que passi desapercbut. Sobretot, perquè el més probable és que l'error es doni en un intró (parts de l'ADN que no codifiquen cap gen) i, per tant, no es manifesti. D'altra banda, si l'error es dona

en un exó, com l'error només és d'una o varies bases, canviaria la proteïna que es codifica, però segurament, aquest canvi seria poc significatiu ja que només modificaria un o pocs aminoàcids (hi ha proteïnes amb més de 200 aminoàcids).

D'altra banda, si l'error afecta tot un gen o una gran part d'un gen, pot manifestar-se provocant que es generi una proteïna totalment diferent a la que estava codificada. Si la proteïna és diferent pot tenir errors molt greus, ja que, possiblement, no compleixi la seva funció. Per exemple, si es codifiqués un enzim anòmal, pot ser que no es doni la reacció en la qual participa l'enzim i la cèl·lula no funcioni bé.

En canvi, si l'error és de tipus cromosòmic, com que afecta a parts més grans, l'error pot ser bastant significatiu. En aquest cas, es poden haver eliminat gens (i per tant no es sintetitzaran unes determinades proteïnes), haver afegit parts noves (que modificarien les proteïnes) o haver afegit gens que no hi deurien ser (creant proteïnes que no deurien estar).

Finalment, els errors poden ser de tipus genòmic. En aquest cas, es poden haver heretat cromosomes de més o de menys i, per tant, es poden sintetitzar proteïnes de més o de menys, generant problemes greus. Per exemple, un excés d'un enzim pot fer que es donin moltes més reaccions que no es produirien normalment

2.5. LES REPARACIONS DELS ERRORS

Les cèl·lules, al detectar un error a l'ADN, intenten reparar-lo mitjançant diversos sistemes, en funció de l'error. Podem distingir entre 3 tipus de reparacions: la reparació directa, la reparació per eliminació i la reparació postreplicativa.

En el primer cas, en la reparació directa, es corregeix l'efecte de la mutació tot seguit de produir-se. Es pot reparar mitjançant la DNA polimerasa, mitjançant la fotoreactivació o altres mètodes per reparar danys com l'alquilació.

En el següent cas, en la reparació per eliminació, s'elimina la part danyada i es repara mitjançant la síntesis de nou ADN correcte.

Finalment, si la cèl·lula no detecta l'error i es replica, pot ser que es corregeixi mitjançant altres sistemes com: la reparació d'aparellaments erronis, la reparació per combinació (o per rescat) o la reparació SOS.

Si cap d'aquests sistemes funciona, la cèl·lula es destrueix a sí mateixa per tal de no traspasar la mutació (apoptosi). Malauradament, si l'error no es detecta i la cèl·lula es replica amb una mutació, totes les cèl·lules filles portaran l'error. En aquests casos, es pot diagnosticar una malaltia genètica. Si l'error es troba a l'ADN i la cèl·lula no el repara, no es pot fer res per curar la malaltia.

O, hi ha alguna opció?

3. TÈCNICA CRISPR

3.1. HISTÒRIA DE LA TÈCNICA CRISPR-Cas9?

Com es diu al llibre “*CRISPR 101*” de (Synthego, n.d.):

La tècnica CRISPR és, avui dia, un dels temes més parlats de la genètica i biologia molecular. Durant molt de temps, uns dels reptes més difícils va ser l'edició genòmica, ja que semblava que era impossible. Malgrat això, es va descobrir que era possible! Encara que, com tot a la vida, té un “però”: les tècniques de modificació gènica eren cares, difícils i necessitaven molt de temps. Després de molts esforços de bioenginyers, biòlegs i altres investigadors, es va descobrir aquesta tecnologia. És relativament recent i s'està convertint en una eina en experimentació en laboratoris.

El principal descobriment que va permetre el desenvolupament de la tècnica CRISPR-Cas9 va ocórrer el 1993, quan es van identificar, per primera vegada, uns segments d'ADN en cèl·lules procariotes anomenats: *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* abreujat com CRISPR. Anys i moltes investigacions després, aquestes “repeticions palindròmiques, curtes, agrupades i regularment intercalades” van ser identificades com un sistema de defensa dels bacteris contra els virus.

Els bacteris, després d'una infecció vírica, insereixen diferents parts de l'ADN víric al seu genoma en forma de segments anomenats CRISPR. Aquests segments fan que la cèl·lula identifiqui els virus en una infecció posterior. D'aquesta manera, aquestes parts es transcriuen i s'uneixen amb una proteïna Cas (CRISPR associated protein), formant una ribonucleoproteïna que trenca l'ADN víric abans que causi algun problema. El trenquen mitjançant el que s'anomena un trencament de doble cadena (DSB per les seves sigles en anglès: *Double-Strand Break*).

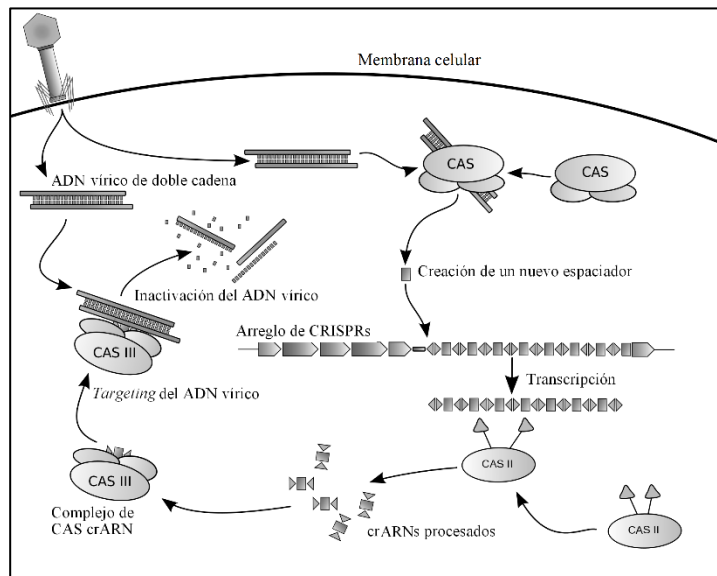


Figura 5 Esquema de Roddelgado - Trabajo propio, CC BY-SA 4.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=38394467>

La gran pregunta, després de saber això, era: com sap la proteïna Cas9 on ha de “trenca” la cadena d'ADN? Doncs, la resposta és bastant senzilla: la proteïna porta incorporat un segment d'ARN conegut com ARN guia (gRNA per les sigles en anglès). Aquest ARN s'anomena guia perquè és complementari a un segment del genoma víric on tallarà la proteïna

Cas9. On ha d' "encaixar" ho anomenarem *target* que significa diana. Amb aquesta tècnica, el *target* té un grau d'especificitat bastant alt. Això li dona certa seguretat a la tècnica.

3.2. COM FUNCIONA LA TÈCNICA CRISPR-Cas9?

Com hem vist, la tècnica CRISPR necessita diversos components: un gRNA que fa *target* en el genoma víric i una proteïna anomenada Cas9.

Aquesta proteïna actua com unes tisores moleculars mentre que el gRNA seria el GPS que la guia a l'ADN viral. Amb aquesta informació, els investigadors poden dissenyar gRNAs per tal que facin *target* en qualsevol secció de l'ADN de qualsevol organisme.

El reconeixement del *target* per la Cas9 depèn d'un altre factor que el fa encara més exacte. Està subjecte a un curt motiu protoespaciador adjacent anomenat seqüència PAM (per les seves sigles en anglès, Protospacer Adjacent Motif).

La PAM varia segons l'espècie d'on prové la proteïna. La Cas9 més utilitzada en laboratori és la provinent del bacteri *Streptococcus pyogenes* (*SpCas9*). En aquest cas, la seva PAM és 5'-NGG-3' on N és qualsevol nucleòtid. Quan l'enzim troba el PAM després del gRNA, crea un DSB.

En canvi, el gRNA consisteix en dues parts: l'ARN CRISPR (crRNA) i l'ARN transcriptor de CRISPR (tracrRNA). El primer, el crRNA és la part complementària a la seqüència a la qual volem que "s'adhereixi". D'altra banda, el tracrRNA és un petit ajudant del crRNA que l'ajuda a madurar i funciona com un "scaffold" (≈ estructura d'andami) per la interacció entre crRNA i la Cas9. En realitat, aquestes dues parts existeixen com a conjunt i se les anomena sgRNA (les sigles de *Single-Guide RNA*). [Generalment, s'utilitza el terme gRNA per referir-se al crRNA].

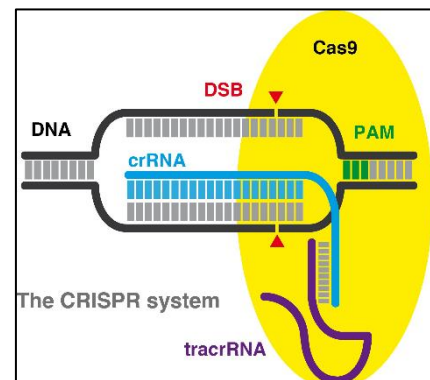


Figura 6 Scheme illustrating the CRISPR-Cas9 mechanism of action (by Lluís Montoliu ©)

En els procediments més senzills, quan la Cas9 genera el DSB, és la cèl·lula qui ho repara. Per fer-ho, pot seguir dos mecanismes: un que només uneix les dues cadenes després del trencament (l'NHEJ) i un altre que inserta o canvia la seqüència mitjançant una "plantilla" (l'HDR).

A l'NHEJ (Non-Homologous End Joining o Recombinació No Homòloga), es lliguen les dues cadenes trencades per la Cas9. Aquest mètode genera

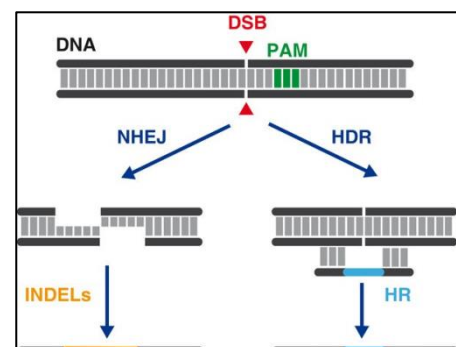


Figura 7 Scheme illustrating the two repair pathways occurring after CRISPR-Cas9 action (by Lluís Montoliu ©)

inserció i/o delecions de bases que poden causar mutacions no desitjades i la inactivació del gen que es volia modificar.

Per aquest motiu, si l'objectiu de l'experiment és canviar la seqüència diana per una altra diferent, la cèl·lula pot fer-ho per un altre camí, l'HDR (Homologous Directed Repair o Reparació homòloga directa). Per realitzar-se, cal introduir una "plantilla" de l'ADN desitjat juntament, amb els components del CRISPR. Les cèl·lules utilitzaran aquesta plantilla per reparar la seqüència trencada, incorporant la modificació desitjada.

Informació extreta de la mateixa font que l'anterior punt: (Synthego, n.d.)

3.3. QUAN ES POT DUR A TERME?

Actualment, aquesta tècnica es pot dur a terme en diferents casos, però els més utilitzats són aquelles en què es necessita modificar una part molt petita de l'ADN, és a dir, s'utilitza per corregir errors gènics.

Avui dia es pot, fins i tot, canviar una sola base de tot el genoma mitjançant aquesta tècnica. Però, normalment, s'utilitza per modificar un tros més gran de l'ADN. D'aquesta manera, es podrien curar moltes de les malalties genètiques. Generalment, el més senzill és aplicar la tècnica a la cura de malalties monosòmiques (que estiguin situades en un sol cromosoma, en un locus determinat), tot i que també es podrien dissenyar diferents gRNAs i dirigir-los a diferents parts del genoma (això augmentaria les probabilitats d'una modificació errònia).

3.4. APLICACIONS DE LA TÈCNICA CRISPR-Cas9

La tècnica es pot aplicar a molts contextos que tenen a veure amb bacteris, cèl·lules, cura de malalties, problemes mediambientals, ...

(Kahn, 2016) ens parla d'un d'ells en la seva xerrada TED. En ella proposa la utilització de la tècnica per modificar l'ADN dels mosquits portadors del virus de la malària per tal que no el puguin transportar.

D'altra banda, (Doudna, 2015) explica que es pot utilitzar la tècnica per crear un trencament de la cadena i induir una reparació i d'aquesta manera, curar malalties com l'anèmia de cèl·lules falciformes o la malaltia de Huntington. També es podria utilitzar per millorar les característiques humanes i d'altres espècies obrint un gran debat ètic (del qual parlarem més endavant).

D'altra banda, l'edició de l'ADN es podria utilitzar per modificar bacteris que poguessin degradar plàstic, com a teràpia gènica (com deia Doudna), per a la síntesi de nous medicaments, per millorar aliments (per tal que siguin més nutritius, que resisteixin unes

determinades condicions, com a cura per infeccions víriques (com el VIH, hepatitis B, ...), com a cura d'alguns tipus de càncer, per a la creació de "nadons a la carta", entre d'altres aplicacions.

3.5. PROTOCOL

Generalment, la majoria de protocols d'aquesta tècnica segueixen els mateixos passos. Podem dividir-los en tres apartats: el disseny dels components, la introducció dels components dins les cèl·lules a tractar i l'anàlisi dels resultats.

El disseny dels components, com el seu nom indica, consisteix a produir tot el necessari per dur a terme la tècnica. Primer s'ha d'analitzar quina és la modificació que es vol generar, on es vol fer i com arribar a ella. S'ha de buscar el crRNA apropiat per què faci diana (*target*) en la localització desitjada i el tracrRNA que l'acompanyarà tenint en compte la seqüència PAM de la Cas9 a utilitzar.

Quan ja tenim tot això dissenyat, cal buscar un vector que introdueixi els components a les cèl·lules a tractar. [En el cas que ens trobem en laboratori, podríem inserir els components directament]. Els vectors més utilitzats són els virus ja que són fàcilment programables i es dupliquen molt ràpid, de manera que poden transmetre la modificació molt ràpidament. Es solen utilitzar virus que admetin plasmidis ja que la cèl·lula els pot llegir fàcilment.

Quan ja tenim clar el vector, cal buscar els plasmidis que posar dins els vectors. Cal que aquests plasmidis siguin específics del virus i que admetin inserir un gRNA (crRNA). Depenent de la font, s'utilitza un mateix plasmidi per portar el gen de la Cas9 i el del gRNA o dos plasmidis per separat. [Normalment els plasmidis tenen altres components com una proteïna amb color perquè es pugui observar si s'ha introduït bé dins la cèl·lula]. D'altra banda, cal que s'insereixin els gens que codifiquen les proteïnes per tal que el virus es repliqui al laboratori utilitzant una línia cel·lular.

Una vegada ja es tenen tots els components dissenyats i inserits en un plasmidi i en un virus, el següent que s'ha de fer és infectar unes cèl·lules. En cas de laboratori, afegiríem directament els virus a la colònia de cèl·lules que hàgim sembrat. En canvi, en la cura d'una malaltia, s'introdueix el vector a l'organisme per a què vagi a les cèl·lules.

En aquest moment, mentre es mantenen les cèl·lules del laboratori en unes condicions molt específiques, es suposa que està actuant la tècnica [es suposa perquè és bastant segur que hi hagi algun error: que el gRNA que hem escollit no faci bé la seva funció, que el vector no infecti les cèl·lules bé, que no es sintetitzi la Cas9, i moltes variables més...] Per aquest motiu, els experiments s'han de repetir diverses vegades fins aconseguir el resultat esperat.

Després d'un temps determinat, cal fer l'anàlisi dels resultats. En aquesta part s'analitzen els resultats. Per fer-ho s'utilitzen diversos mètodes. El més evident és veure si el gen que hem

modificat s'expressa correctament o si es segueix expressant de la mateixa manera, per exemple, si modifiquem un gen que s'encarrega d'una proteïna, analitzarem si aquesta proteïna segueix sent igual o bé és diferent (mitjançant tècniques com l'electroforesi, l'immunofluorescència...). Un altre mètode és seqüenciar la part del genoma que hem modificat i analitzar si s'ha produït la mutació.

Si els resultats no són els esperats, com en qualsevol altre experiment, cal modificar el que es pensa que està malament i tornar a repetir l'experiment fins obtenir els resultats desitjats.

[Hi ha un exemple de protocol publicat en la revista *Nature* en *RECOMANACIONS/ANNEXOS*]

3.6. BENEFICIS DE LA TÈCNICA

El principal benefici d'aquesta tècnica és, evidentment, que pot modificar una regió del genoma específica. Per aquest motiu, pot curar malalties genètiques. Avui dia, el tractament per aquestes malalties és de tipus simptomàtic, és a dir, que no donen solució sinó que tracten els símptomes. Això significa que l'afectat sempre tindrà la malaltia.

Aquesta tècnica tan innovadora té bastants beneficis respecte les altres tècniques de modificació genètica conegudes:

Type	ZFNs	TALENs	AAV	CRISPR
Cost	High	High	Moderate	Affordable
Complexity	Difficult	Difficult	Difficult	Easy
Multiple edits	Difficult	Difficult	Difficult	Easy

Taula 1 Comparació de la tècnica CRISPR amb altres tècniques de modificació genètica (Extreta del llibre electrònic: *CRISPR 101* de Synthego)

Com podem veure a la taula, la tècnica CRISPR/Cas9 té menor cost comparat amb les altres tècniques. D'altra banda, la complexitat de la tècnica és molt més senzilla igual que la possibilitat de fer múltiples edicions.

Aquesta tècnica és també molt més efectiva que altres utilitzades per "curar" malalties genètiques gràcies al seu sgRNA. El sistema de "rastreig" de la mutació és molt específic i fa que la utilització de la tècnica sigui bastant segura.

[Hi ha una petita explicació de les altres tècniques en *RECOMANACIONS/ANNEXOS*]

3.7. INCONVENIENTS DE LA TÈCNICA

Malgrat que la tècnica CRISPR és bastant segura, té alguns inconvenients.

Primerament, cal recordar que aquesta tècnica es basa en l'ús de molècules. És a dir, malgrat que pensem que actuen com una màquina, actuen com molècules i, per tant, poden haver errors.

Pot ser que la Cas9 no funcioni bé (perquè no s'ha transcrit bé, perquè el vector s'hagi danyat, etc) i produeixi els DSB en llocs que no són els desitjats o no els produeixi. També pot ocórrer que el sgRNA es transcriu malament fent que la Cas9 no faci bé la seva funció, que actuï en un altre lloc o bé, que no trobi el seu segment diana.

D'altra banda, si volem modificar unes cèl·lules en concret cal assegurar-nos que els components per dur la tècnica arribin bé a les cèl·lules desitjades.

En tots aquests casos, un error en la tècnica podria generar una altra mutació fent que l'organisme tractat no es curi de la seva malaltia i que, a més a més, tingui un altre problema a solucionar.

4. BIOÈTICA:

4.1. QUÈ ÉS?

Segons el (CSIC (Consejo Superior de Investigaciones Científicas), n.d.):

“En l'àmbit de l'ètica, la bioètica s'ocupa d'examinar i definir aquells principis que proporcionin una òptima conducta humana en relació amb la vida, ja sigui aquesta la referida a l'home, a la vida animal o vegetal, així com al mitjà en el qual poden donar-se les condicions acceptables per a l'existència.

La bioètica, per tant, no es limita a l'àmbit estrictament mèdic, sinó que, a més, incorpora conflictes i problemes ètics que tenen a veure amb la vida en el seu sentit més extens, ampliant, amb això, el seu camp a qüestions vinculades amb el medi ambient i al tracte a causa dels animals.”

De manera pràctica, podem dir que és l'ètica, la determinació del què és correcte o no, aplicada als éssers vius.

A España, la bioètica és controlada pel CBE, el Comitè de Bioètica d'Espanya que es defineix segons la Llei 14/2007, de 3 de juliol, d'Investigació Biomèdica (BOE 4 de juliol) com: “òrgan col·legiat, independent i de caràcter consultiu, sobre matèries relacionades amb les implicacions ètiques i socials de la Biomedicina i Ciències de la Salut.” Aquest òrgan s'encarrega de fer informes, propostes i recomanacions sobre bioètica a altres institucions, a establir principis per l'elaboració de bones pràctiques per la investigació i la representació d'Espanya en fòrums i organismes supranacionals i internacionals implicats en la bioètica, entre d'altres

4.2. QUAN I PER QUÈ ACTUA?

La bioètica és essencial per a la ciència, ja que, avui dia, la majoria de descobriments científics apareixen molt ràpidament. Aquests poden afectar la natura si no es controlen. Per això, la bioètica ha d'actuar sempre que es descobreixi quelcom que pugui alterar la vida.

Per exemple, quan es va descobrir que es podien inserir gens dins d'aliments per donar-los qualitats diferents, va fer falta que es fes una exhaustiva investigació sobre si això era correcte o no. En aquesta investigació s'havien d'avaluar els riscos i/o beneficis que podien tenir pels éssers vius i, en aquest cas, pels agricultors i ramaders. La conclusió final (segons Rodríguez Yunta, 2013) va ser la següent: “Si la tecnologia d'aliments transgènics s'introdueix, ha de fer-ho considerant la participació d'agricultors, ramaders i consumidors, i no guiar-se simplement per interessos polítics i comercials d'empreses transnacionals. Hi ha temes de sostenibilitat a llarg termini i riscos ecològics que han de contemplar-se, tenint en compte els principis de precaució i responsabilitat cap a generacions futures, en primer lloc.”

4.3. TÈCNICA CRISPR vs BIOÈTICA

La tècnica CRISPR, al ser una tècnica de modificació genòmica, cal que sigui mirada amb lupa, ja que, modificant els gens d'un organisme, podem fer bones o males accions.

La principal bona acció que es pot fer és la més evident: curar malalties genètiques mitjançant teràpia gènica. Segons el web (Bioetica web, n.d.), des d'un punt de vista ètic cal fer una sèrie de consideracions. *(Per més informació, veure RECOMANACIONS/ANNEXOS).*

En resum, la modificació genòmica i/o teràpia gènica és ètica sempre que sigui estrictament necessària (no hi hagi un altre tractament), no afecti la línia germinal (és a dir, que no es considera bioètic la modificació d'espermatozoides o òvuls) i no es faci per millorar característiques humanes com comportament, intel·ligència o aspectes físics, entre d'altres.

Les anteriorment citades poden ser unes males accions. No es considera ètica la utilització de la tècnica si existeixen altres tractaments, encara que siguin experimentals, ja que treuen lloc a la indústria mèdica i a la investigació. D'altra banda, de moment, no és ètic modificar la línia germinal ni els seus productes (és a dir, l'embrió i les seves següents cèl·lules), ja que si es modifica la línia germinal, es modifica totes les següents generacions de l'individu.

Finalment, no es poden modificar característiques humanes per un motiu: si es pogués fer, es podrien fer el que s'anomenen bebès a la carta, és a dir, podria arribar al punt en què els familiars escollissin com volen el seu fill. D'aquesta manera, s'acabaria amb la biodiversitat i es podrien generar tot tipus de conflictes.

PART II: LA TÈCNICA CRISPR COM A CURA PER A
LA MALALTIA DE HUNTINGTON

0. OBJECTIUS I METODOLOGIA:

0.1. OBJECTIUS:

Els objectius de la part pràctica són:

- Conèixer la Malaltia de Huntington i poder aplicar la tècnica CRISPR per una possible cura.
- Aprendre el vocabulari científic-tècnic utilitzat al laboratori
- Conèixer el material i procediments principals d'un laboratori de tipus professional.
En concret:
 - Conèixer com es dissenyen els gRNAs necessaris per dur a terme la teràpia gènica de la malaltia de Huntington.
 - Aprendre les principals tècniques de validació per a les modificacions gèniques i dur-les a terme.
- Aprendre a utilitzar programes d'edició genètica com: *Benchling*.
- Ser capaç d'analitzar els resultats obtinguts dels experiments.
- Ser capaç d'analitzar les respostes obtingudes del formulari de "Les Modificacions Genètiques: Bioètica i Societat" amb l'ajut del programa *Microsoft Office Excel*.
- Desenvolupar un blog amb les experiències viscudes al PCB: (practiquesalpcb.wordpress.com)

0.2. METODOLOGIA:

Aquesta segona part, es basa en l'etapa d'experimentació del mètode científic. En aquesta realitzaré tres dels punts mencionats a la metodologia general del treball:

- Estada pràctica al Parc Científic de Barcelona sota la tutoria de la Dra. Erika López pel disseny experimental on s'han realitzat les següents activitats
 - Disseny de gRNAs amb el programa *Benchling*
 - Validació de mostres mitjançant una tècnica d'immunofluorescència.
- Entrevista al Dr. Esteban Muñoz, especialista en la malaltia de Huntington
- Enquestes a través de Google Forms a la població per analitzar l'opinió de la societat respecte de les modificacions genètiques.

1. LA MALALTIA DE HUNTINGTON

1.1. QUÈ ÉS ?

“La malaltia de Huntington (també l’anomenaré MH, a partir d’ara) o Corea de Huntington és una malaltia neurològica que ocasiona una degeneració de les cèl·lules nervioses del cervell.” (ACMAH, 2009).

“Antigament, era denominada Corea de Huntington a causa que la corea és l’element estètic més característic d’aquesta patologia.”(López del Val & Burguera Hernández, 2010) Aquest terme ja no s’utilitza perquè, com veurem, la corea no és l’element principal de la malaltia.



Figura 8 Fotografia de Mary Evans Picture Library: Boys afflicted with Chorea, known as St Vitus' dance, or as Danse de Saint-Guy in France Date circa 1880

“Aquesta malaltia és minoritària, ja que afecta, aproximadament, un de cada 10.000 habitants a Europa, malgrat que també existeix a la resta del món amb diferents proporcions. És una malaltia hereditària que es pot transmetre, tant a homes com a dones, sense diferències de classe social o de grup ètnic.”(ACHE, n.d.)

“Provoca un ampli impacte a nivell cognitiu, perdent la capacitat funcional personal, a nivell motor, provocant moviments involuntaris i, a nivell psicològic, causant problemes emocionals com: l’apatia, la irritabilitat, la depressió, ...” (López del Val & Burguera Hernández, 2010)

La peculiaritat d’aquesta malaltia és l’edat en què es comencen a donar els símptomes. “Aquesta malaltia es manifesta normalment entre els 30 i 50 anys.” (National Institute of Neurological Disorders and Stroke, n.d.)

“Malgrat això, hi ha una variable de la malaltia que es manifesta als 20 anys, la Malaltia de Huntington juvenil i una altra que es presenta més tard dels 60 anys i es considera tardana o senil. Les formes juvenils representen aproximadament el 4-6% del total d’afectats i les senils es situarien al voltant del 8-10%” (López del Val & Burguera Hernández, 2010)

1.2. CAUSES

La malaltia de Huntington, al ser hereditària, és transmesa de pares a fills. Una persona que té la malaltia l’ha d’haver “rebut” dels seus pares amb un dels 3 possibles al·lels.

Com que és hereditària, té un gen que no és el correcte, és a dir, que no funciona com hauria de fer-ho. En aquest cas, el gen que no funciona correctament és el que codifica la huntingtina. En els pacients, aquest gen ha mutat i, per tant, codifica la proteïna mutada que genera els símptomes característics d’aquesta malaltia.

La mutació que produeix la malaltia és una repetició excessiva de triplets CAG que, al traduir-se, formaran una cadena de l'aminoàcid glutamina (cadena poliQ) més llarga del que hauria de ser.

Les cèl·lules que són danyades per aquesta malaltia són les neurones. L'acumulació de huntingtina modificada genera la degeneració del teixit neuronal. La malaltia es manifesta quan aquesta acumulació és significativa, "sol ser entre els 30 i 50 anys, malgrat que l'edat d'inici pot ser molt variable, des de la infància fins als 75 anys."(ACMAH, 2009)

Segons el llibre de (López del Val & Burguera Hernández, 2010) depenent del nombre de repeticions CAG del gen IT15 distingim tres tipus d'al·lels:

- Normal: Contenen entre 10 i 26 repeticions.
- Intermedis: Contenen entre 27 i 34 repeticions. Els portador no desenvolupen la malaltia però, a causa de la inestabilitat de la seqüència CAG, existeix el risc que aquesta s'expandeixi als seus fills fins arribar al rang patològic. S'anomenen al·lels mutables.
- Patològics: Contenen 36 o més repeticions. Les persones portadores tenen una alta probabilitat de desenvolupar la malaltia. Aquests es poden classificar en dos grups:
 - Al·lels de baixa penetrància. Contenen entre 36 i 39 repeticions i els seus portadors poden no desenvolupar la malaltia fins a una etapa tardana.
 - Al·lels de penetrància completa: Contenen 40 o més repeticions i s'associen a la presència de manifestacions clíniques.

PERSONES NO AFECTES		PERSONES AMB LA MALALTIA DE HUNTINGTON		
NORMAL	INTERMEDI	PENETRÀNCIA REDUÏDA	PENETRÀNCIA COMPLETA	
CAG ≤ 26	CAG 27-35	CAG 26-29	CAG 40-55	CAG ≥ 60
Sense símptomes		Forma tardana: algunes persones poden no desenvolupar símptomes	Forma adulta, generalment	Forma juvenil

Taula 2 Esquema dels diferents rangs de repeticions CAG en la malaltia de Huntington. Pres de: (López del Val & Burguera Hernández, 2010) (adaptat de: Semaka, Creighton, Warby, & Hayden, 2006)

1.3. SÍMPTOMES

Tota la informació d'aquest apartat ha estat extreta de: (López del Val & Burguera Hernández, 2010)

Els símptomes (o manifestacions) de la malaltia de Huntington es classifiquen normalment en: motors i no motors.

Els símptomes motors són els característics dels antigament anomenats síndromes hipercinètics que tenen com a principal característica la corea. La MH té una àmplia varietat de manifestacions motores:

- Corea: Són aquells moviments fluctuants, impredecibles, d'amplitud i velocitat variable, que apareix en a qualsevol àrea (sobretot a la cara i al tronc)
- Distònia: Són contraccions involuntàries en músculs. Uns exemples són les torsions i moviments repetitius
- Mioclònia: És típica de la MH juvenil. Descriu aquelles estirades i sacsejades involuntàries i súbdites d'un o més músculs.
- Tics: Són aquells moviments repetits ràpidament de manera incontrolada
- Discinèsia tardana: És causada per neurolèptics. És un altre moviment involuntari que afecta majoritàriament la part inferior de la cara.
- Bradicinèsia: És l'alentiment dels moviments
- Parkinsonisme: És una barreja entre bradicinèsia, rigidesa i pèrdua de reflexos posturals.

En canvi, les principals manifestacions no motores es poden classificar en tres subgrups.

El primer subgrup engloba manifestacions semblants a alteracions psiquiàtriques comuns:

- Depressió major: La seva prevalença és molt alta dins de pacients amb la malaltia de Huntington.
- Mania i síndrome bipolar: Una presentació clàssica de la mania inclou: un estat d'ànim irritable, una autoestima exagerada i síndromes d'hiperactivitat
- Quadres psicòtics: inclouen deliris i al·lucinacions. El quadre psicòtic més freqüent és un quadre paranoic acompanyat amb agressivitat, irritabilitat i escàs control d'impulsos, deliris aïllats i estadis psicòtics similars als de l'esquizofrènia
- T.O.C: Trastorn Obsessiu Compulsiu caracteritzat per pensaments intrusius, recurrents i persistents, que produeixen inquietud, aprensió, temor o preocupació, i conductes repetitives denominades compulsions, dirigides a reduir l'ansietat associada.

L'altre grup, correspon a manifestacions no motores característiques de la MH. Aquest grup és el més difícil per a les famílies, ja que els familiars han d'entendre que aquests símptomes són causats per la malaltia i no per la pròpia persona. Les afectacions són les següents:

- Síndrome de disfunció executiva: Els pacients d'aquest síndrome es tornen apàtics, irritables, desinhibits, impulsius, obsessius i perseverants
- Apatia
- Irritabilitat
- Perseverança

D'altra banda, hi ha altres alteracions no específiques ni comunes que poden aparèixer en la malaltia de Huntington. Uns exemples són

- Delirium
- Desmoralització
- Problemes sexuals
- Problemes de la son.

Finalment, la MH provoca també un altre tipus de símptoma que no és ni motor ni psicològic: produeix afectacions cognitives. Les principals són

- Afectació a la memòria, l'atenció, el judici i les funcions executives
- Demència: trastorns afectius i l'alteració de l'organització
- Afectació del record lliure sense claus
- Alteracions a la memòria recent, remota i de treball
- Dificultat en funcions executives frontals: abstracció, judici, raonament, seqüenciació, organització, planificació, ...

Podem resumir les característiques de la Malaltia de Huntington a la següent taula extreta de la mateixa font que tot aquest punt: (López del Val & Burguera Hernández, 2010)

Trastorns motors	<ul style="list-style-type: none"> • Alteració de moviments sacàdics • Moviments involuntaris. Incapacitat per suprimir la mirada reflexa a estímuls visuals nous. • Impersistència motora de la llengua • Alteració dels moviments ràpids alternatius • Trastorns de l'equilibri • Acatísia
Trastorns psiquiàtrics	<ul style="list-style-type: none"> • Irritabilitat, agressivitat i alteracions de la personalitat. • Depressió, ansietat, apatia i augment del risc de suïcidi • Disminució de la iniciativa, espontaneïtat i sociabilitat • Pensament obsessiu i comportament compulsiu • Al·lucinacions, delusions, paranoia i psicosis • Afectació del <i>insight</i>
Trastorns cognitius:	<ul style="list-style-type: none"> • Disminució en el manteniment de l'atenció • Descens en la fluència verbal • Fallada en les estratègies de la recuperació de la informació • Disminució de la capacitat d'aprenentatge • Defecte en la memòria de processament • Alteració en l'orientació espacial egocèntrica

	<ul style="list-style-type: none"> • Disfunció executiva: planificació, organització, seqüenciació, abstracció i judici.
--	---

Taula 3 Característiques de la Malaltia de Huntington. Extreta de: (López del Val & Burguera Hernández, 2010)

Finalment, cal dir que les manifestacions estan molt relacionades amb l'edat de començament dels símptomes. Les formes de començament juvenil tendeixen a presentar rigidesa des de molt aviat i deteriorament mental greu de forma relativament precoç mentre que en les formes més tardanes, és més freqüent que es presenti la forma més pura de corea.

1.4. DIA A DIA D'UNA PERSONA AFECTADA

Igual que l'apartat anterior, informació extreta de: (López del Val & Burguera Hernández, 2010)

El dia a dia d'una persona afecta per la malaltia depèn de l'estat d'aquesta. No és el mateix per a una persona que fa 2 anys que la desenvolupa, que una persona que en fa 15, d'anys.

Actualment, es divideix l'evolució de la malaltia en tres fases clíniques diferenciades en 5 anys de progressió cada una:

- Al primer estadi o fase, el pacient acaba de començar a manifestar símptomes neurològics i psiquiàtrics com la depressió. El símptoma més important sol ser el corea però no arriba a provocar discapacitat, de manera que el pacient pot mantenir un treball amb complexitat física i responsabilitat. Només a la malaltia de tipus juvenil, la rigidesa i altres símptomes motors resulten importants.
- A la segona fase, la discapacitat física comença a ser important. La corea es presenta de manera més pronunciada: els aspectes motors es generalitzen i es fan més evidents. D'altra banda, la capacitat del pacient per decidir i organitzar disminueix. L'associació de símptomes motors amb la persistència dels psiquiàtrics augmenta cada vegada la càrrega familiar física i psicològica.
- En un tercer estadi, el pacient entra en una etapa de dependència completa amb els familiars i l'entorn. Apareixen i persisteixen tot tipus de trastorns: perden gairebé la funció cognitiva, tenen severos problemes psicològics i manifesten trastorns greus i generalitzats. Tot això genera una discapacitat completa.

1.5. PRONÒSTIC I ACTUAL TRACTAMENT

Igual que als anteriors punts, la informació s'ha extret de: (López del Val & Burguera Hernández, 2010)

El pronòstic actual per a persones afectades és bastant negatiu.

Actualment no existeix un tractament curatiu malgrat que, gairebé tots els estudis, situen, entre 15 i 20 anys després dels primers símptomes, la mort del pacient.

Les principals causes de mort dels pacients amb Malaltia de Huntington són complicacions associades a la malaltia causades per la combinació de la immobilitat, tendència a fer respiracions bronquials, pèrdua de pes i la debilitat general. Això deixa al pacient en un estat molt vulnerable d'altres malalties. En la majoria de casos, les principals causes de mort són infeccions tipus pneumònia (42% dels casos), problemes cardiovasculars (33% dels casos), suïcidis (3%) i altres causes com el càncer (3%)

Donada la variabilitat de les manifestacions d'aquesta malaltia, és necessari fer un tractament individualitzat i específic per a cada pacient.

Actualment, l'abordatge mèdic es pot plantejar en cinc aspectes diferents que explicaré, més detalladament, a continuació:

- 1) Tractament simptomàtic destinat a disminuir els signes i símptomes de la malaltia.
- 2) Tractament neuroprotector amb el qual es pretén fer més lent el curs natural de la malaltia.
- 3) Tractament neurorestaurador encaminat a fer disminuir els efectes destructors derivats de la progressió. (encara en estudi)
- 4) Tractament curatiu amb teràpia gènica. **(explicat al següent punt)**
- 5) Intentar la erradicació definitiva de la malaltia mitjançant consell genètic.

1) Tractament simptomàtic destinat a disminuir els signes i símptomes de la malaltia.

El tractament simptomàtic és diferent per a cada pacient i depèn dels símptomes que presenti.

El símptomes motors són tractats una vegada interfereixen o invaliden les activitats de la vida diària del pacient o produeixen una greu interferència sociolaboral. Ens aquests casos, es procedeix a l'administració de fàrmacs bloquejants de la activitat dopaminèrgica cerebral, per tractar la corea i toxina botulínica, per tractar la distònia.

Els primers, que poden ser neurolèptics o deplectors presinàptics de la dopamina, tenen un efecte anticoreic, pel seu benefici en l'ansietat del pacient sense produir sedació. D'altra banda, la distònia es pot tractar amb toxina botulínica que dona grans resultats al millorar la contracció mantinguda i a l'alleujar el dolor.

Els símptomes psicològics com la depressió, l'ansietat, l'apatia i el T.O.C. poden ser manifestacions predominants i han de ser tractats o previnguts per un suport psicològic i amb activitats de teràpia ocupacional. Els neurolèptics utilitzats per reduir la corea també serveixen per tractar l'ansietat i el control dels impulsos. En aquests casos, s'intenta evitar altres famílies de fàrmacs antidepressius ja que poden empitjorar la cognició.

El tractament del deteriorament cognitiu és més pràctic que no pas farmacològic. Les millors estratègies per mantenir les capacitats cognitives són l'estimulació cognitiva diària i la teràpia ocupacional, que mantinguin les ments actives i als pacients socialment integrats.

D'altra banda, existeixen altres tractaments per tal d'ajudar o millorar la qualitat de vida d'una persona amb aquests símptomes: fer que no es sentin sols o abandonats millora els símptomes com la depressió, la rehabilitació motora tant per prevenir com per alleugerir el deteriorament i la logopèdia per tal d'intentar que el llenguatge no es deteriori i evitar problemes de deglució

2) Tractament neuroprotector amb el que es pretén fer més lent el curs natural de la malaltia.

Un d'aquests tractaments es basa en oligonucleòtids antisentit.

“Hi ha hagut un assaig clínic en molt pocs centres, en el qual s'ha vist que és un tractament segur ja que s'aplica a nivell intratecal, en el líquid cefalorraquidi, mitjançant una punció lumbar en la qual s'injecten aquests oligonucleòtids que eviten la síntesi de la proteïna mutada, la huntingtina. El que s'ha vist és que aquest tractament és segur i que redueix els nivells de huntingtina mutada al líquid cefalorraquidi” Extret de l'entrevista al doctor Esteban Muñoz (*Per més informació, veure [ANNEXOS/RECOMANACIONS](#)*).

5) Erradicació definitiva de la malaltia mitjançant consell genètic

Realment, el consell genètic no té com a finalitat l'erradicació de la malaltia sinó ajudar al pacient o possible pacient informant-lo abans i durant la malaltia.

“En el cas que es sol·liciti un diagnòstic presimptomàtic, s'ha d'aplicar el procediment de Consell Genètic. Aquest no consisteix que un especialista digui que el pacient ha de fer-se la prova, sinó que informa de tots els avantatges i inconvenients de saber si ets portador de la mutació que produeix aquesta malaltia.

El conseller, que ha de tenir coneixements de la malaltia, ha de presentar, de manera objectiva i sense intentar no influir en la decisió de la persona, els avantatges i inconvenients de saber això. És un procés en el qual es pretén ajudar la persona i no fer-li mal; per això, abans de fer un estudi genètic, has d'assegurar-te que la persona està capacitada per acceptar un diagnòstic que pot ser negatiu per a ella. Per aquest motiu, moltes vegades, abans de l'estudi genètic, es fa un estudi psicològic/ avaluació psiquiàtrica. En aquest moment, si tot és correcte i la persona vol fer aquest estudi i ha sospesat tots els avantatges i els desavantatges, es comença el procediment de l'estudi presimptomàtic.” Extret de l'entrevista al doctor Esteban Muñoz (*Per més informació, veure [ANNEXOS/RECOMANACIONS](#)*).

Malgrat això, aquest consell genètic es podria aplicar a l'erradicació de la malaltia. Si no hi ha descendència de persones afectades, la malaltia podria erradicar-se

2. LA TÈCNICA CRISPR/Cas9 COM A TERÀPIA GÈNICA

2.1. PER QUÈ UTILITZAR LA TÈCNICA CRISPR/Cas9

“La teràpia gènica és una tècnica que utilitza gens per tractar o prevenir malalties. Aquesta pot abordar diferents vies: reemplaçar un gen mutat per una còpia sana, inactivar un gen mutat que no funciona correctament o introduir un nou gen per lluitar contra la malaltia” (Genetics Home Reference - NIH, n.d.)

La teràpia gènica podria ser la solució per a moltes malalties gèniques hereditàries ja que podríem canviar, eliminar o desactivar el gen que produeix l'alteració.

La tècnica CRISPR és una tècnica de teràpia gènica que pot eliminar seqüències d'ADN i substituir (o no) el tros tallat per un sa. D'aquesta manera, podem aplicar aquesta tècnica a qualsevol malaltia com a tractament curatiu. A més a més, aquesta tècnica és perfecta per a la teràpia gènica ja que és bastant segura i eficaç

En aquest cas, aplicarem la tècnica a la Malaltia de Huntington. A la MH, el que produeix els efectes de la malaltia és l'acumulació de la proteïna de huntingtina modificada. Un estudi demostra que “una disminució de huntingtina normal, en ratolins adults, no afecta la supervivència, creixement o viabilitat neuronal en animals” (Wang, Liu, Gaertig, Li, & Li, 2016) i un altre estudi ha mostrat que “la regió N-terminal de la huntingtina no és essencial en el desenvolupament d'embrions) (Liu et al., 2016).

En conclusió, podem eliminar el gen de la huntingtina per tal que no es formi la huntingtina mutada i no es desenvolupi la malaltia de Huntington.

Donat això, es dedueix que l'objectiu de la teràpia gènica és fer arribar la tècnica CRISPR/Cas9 a les cèl·lules del cervell perquè una vegada dins, detingui la creació de huntingtina modificada permanentment.

2.2. PROPÒSIT DE LA TÈCNICA CRISPR (què ha de fer la tècnica CRISPR)

La tècnica CRISPR és perfecta en aquest cas ja que, per aconseguir eliminar el gen de la huntingtina modificada, només cal que la Cas9 faci un DSB en cada un dels extrems de la seqüència poliQ. La cèl·lula repararà aquesta deleció mitjançant NHEJ i seguirà funcionant normalment.

Com hem vist, per dur a terme la tècnica necessitaria: els gRNAs que facin diana en la seqüència d'ADN anterior i posterior a la seqüència que volem “tallar” (un *guide* per l'extrem 5' i un altre per l'extrem 3') i inserir-los en un plasmidi que inclogui l'*scaffold* per tal que s'uneixi a la Cas9; l'enzim Cas9 i un vector que insereixi els gRNAs i la Cas9 dins les cèl·lules a tractar.

D'aquesta manera, la Cas9 localitzarà on ha de tallar i farà un DSB que, directament, traurà la seqüència modificada de la huntingtina.

2.3. COMPONENTS PER A LA TÈCNICA (gRNAs, Cas9, plasmidis, vectors)

A l'hora de dissenyar els components, vaig rebre la tutoria i l'ajuda de la Dra. Erika López, durant l'estada al PCB. Vam utilitzar l'article de (Yang et al., 2017) com a referència.

El meu objectiu és fer arribar la tècnica CRISPR a les neurones (és a dir, realitzar una teràpia gènica *in vivo*) d'un ésser humà ja que, com hem vist, no es considera ètic modificar la línia germinal o els embrions.

La manera per fer arribar els components a les cèl·lules és utilitzar un vector. En aquest cas, he utilitzat un adeno-associated virus (AAV). Aquest vector és molt eficient per les següents característiques: "no s'han associat amb cap malaltia humana i genera una molt baixa resposta immune en humans" (Mena-Enriquez, Flores-Contreras, & Armendáriz-Borunda, 2012).

Una vegada vaig saber el vector a utilitzar, vaig buscar un plasmidi on inserir els gRNAs i la Cas9. Per fer-ho, vaig utilitzar el repositori de plasmidis *addgene*, específicament, la secció d'AAV (<https://www.addgene.org/viral-vectors/aav/>). En aquesta secció, hi ha tots els plasmidis que es comercialitzen per a AAV. En el meu cas, en vaig buscar dos: un per inserir-li el gRNA i un altre per la Cas9. Els tres que vaig escollir van ser: el PX552 (pels gRNAs), i dos PX551 (el #107024 que té inclosa la **SpCas9** i el #107032 que té la **SaCas9**).

Una vegada ja vaig tenir els plasmidis, vam passar al disseny de gRNAs.

Per fer-ho, vaig haver de tenir en compte la seqüència PAM, que és diferent per a cada Cas9, ja que "la Cas9 tallarà entre el 3r i 4t nucleòtid després del gRNA per l'extrem 5' ". (_Zhang Lab's, n.d.)

"Existeixen 2 tipus de Cas9: la SpCas9 (la més comuna) i la SaCas9. Es diferencien per l'espècie de la qual provenen: la primera prové del bacteri *Streptococcus pyogenes* (d'aquí les sigles Sp) i l'altra prové del bacteri *Staphylococcus aureus* (Sa). Les diferències entre aquestes dues són bastant significatives: la proteïna SaCas9 és més petita que la SpCas9, però amb el mateix poder d'edició genètica; la SaCas9 té un PAM diferent, més complex a la SpCas9 (la Sp té 5'-NGG-3' i la Sa té 5'-NNGRRT-3', on N és qualsevol nucleòtid i R és o bé adenina o bé guanina, les bases purines) això fa que el *target* sigui més segur i específic. Tècnicament, té un risc menor d'*off-target cleavage*, és a dir, que té un risc menor d'interaccions inespecífiques amb la diana de l'ADN. Finalment, la SaCas9 és més eficient que la SpCas9 ja que necessita menys enzims i menys temps per fer la "unió" amb la diana." (AMB.Inc, n.d.)

Sabent això, vaig decidir que era més segur utilitzar la SaCas9 però, com que té un PAM més complex, és més difícil trobar gRNAs amb aquest PAM.

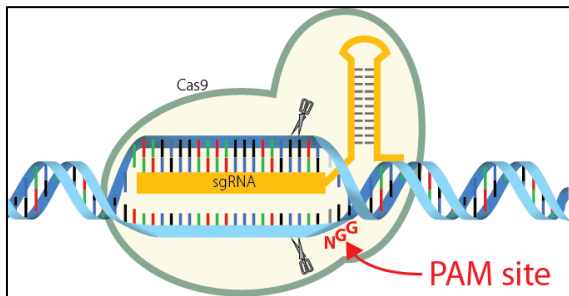


Figura 10 Esquema localització PAM. Extret de: <https://www.idtdna.com/pages/support/faqs/what-is-a-pam-sequence-and-where-is-it-located>

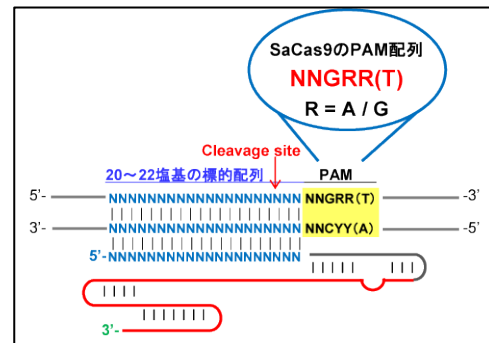


Figura 9 Esquema PAM de SaCas9 Extret de: http://catalog.takara-bio.co.jp/product/basic_info.php?unitid=U100009191

2.4. PROCEDIMENT PER AL DISSENY DE gRNAs

Per escollir el gRNAs a utilitzar, vaig utilitzar el programa *Benchling* i vaig seguir el següent procediment:

- 1) Vaig importar la seqüència d'ADN que contenia el gen de la huntingtina. La seqüència que vaig importar pertanyia a un "genoma humà de referència" (GRCh38) i per tant, no tenia l'alteració.
- 2) Vaig retallar la seqüència per centrar-me en l'exó 1 que és on hi ha la mutació als organismes afectats, deixant un part de la seqüència abans i després de l'exó.
- 3) Vaig utilitzar l'eina CRISPR que ofereix el programa, que té com a funció analitzar tots els possibles gRNAs del tros d'ADN que és seleccionat.
- 4) Primer vaig dissenyar els gRNAs per la SpCas9 amb el PAM corresponent (5'-NGG-3'). Vaig fer el procés dos cops: un per l'extrem 5' i l'altre per l'extrem 3'. Per seleccionar els *guides* vaig tenir en compte el següent:
 - a. El gRNA ha d'estar bastant a prop de la seqüència a tallar per evitar eliminar més del necessari.
 - b. La seqüència pertany al cromosoma 4 (per obtenir un bon resultat cal especificar la regió del genoma al qual pertany la regió)
 - c. L'*On-Target Score*: "Una major puntuació (0-100) significa una major expectativa d'activitat" (Geneious, 2016)
 - d. L'*Off-Target Score*: "Una major puntuació (0-100) denota menys activitat fora del *target*" (Geneious, 2016)
- 5) Després, vaig fer el mateix procés, però per a la SaCas9 amb el seu PAM corresponent (5'-NNGRRT-3'). En aquest cas, com que el PAM és més complex, hi ha menys a escollir i la majoria tenen uns *on* i *off-target score* molt baixos.

- 6) Una vegada ja vaig tenir els gRNAs, vaig haver de introduir-los (en el programa) dins de vectors, però, per fer-ho, vaig haver de tenir en compte:
 - a. La localització dins del plasmidi on posar els gRNAs (el que introduueixo dins dels plasmidis són les seqüències d'ADN que es transcriuran en gRNA): just després del promotor (lloc on es comença la transcripció) i abans del *gRNA scaffold* (l'estructura que ajudarà a la unió amb la Cas9).
 - b. Que hi hagi un lloc específic on talli un enzim de restricció.

- 7) En el meu cas, l'enzim de restricció, que obriria el plasmidi per inserir el *guide*, està entre el promotor i l'*scaffold*. Aquest es diu SapI i té dos punts de tall que generarien la deleció d'una seqüència en concret, deixant un espai on s'introduiria la seqüència d'ADN que codificaria el *guide*.

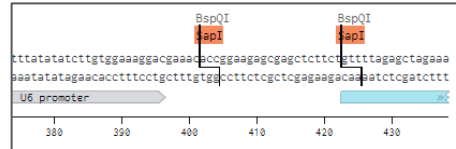


Figura 11 Seqüència d'ADN on l'enzim SapI talla. Extret del programa Benchling

Aquest enzim en concret talla d'una manera molt específica la cadena 5'→3', un nucleòtid després d'una seqüència específica (5'- **GCTCTTCN**-3') i, en la cadena 3'→5', l'enzim trenca la cadena quatre nucleòtids després de la cadena complementària a la seqüència específica (3'-



Figura 12 Esquema de com talla l'enzim SapI. Extret de: http://utminers.utep.edu/rwebb/html/class_ij__rare_cuts.html

CGAGAAGNNNN-5'). Per aquest motiu, hem de demanar els gRNAs tenint en compte aquesta característica. Com que vaig contemplar aquest requisit, vaig adaptar els gRNAs, afegint uns quants nucleòtids davant i uns quants darrera, que el faran compatible amb el trencament.

- 8) Com que el programa no em deixava dissenyar els *guides* adaptats, els vaig fer a mà i després els vaig inserir al plasmidi (en anglès s'utilitza el terme "fer un *assembly*"= fer un acoblament)

Els gRNAs es troben en l'apartat de resultats.

2.5. PROCEDIMENT DE L'EXPERIMENTACIÓ/ APLICACIÓ DE LA TÈCNICA

Aquest punt correspon al disseny experimental respecte què hauríem de fer a l'hora d'aplicar la tècnica, però no vaig poder fer-lo per falta de temps i diners.

El que hauria de fer és el següent:

- 1) Disseny de components pel *targeting* (fet al punt anterior).
- 2) Comprar plasmidis de AAV:
 - a. Els quals utilitzarem per inserir els *guides*.
 - b. Els que contenen la Cas9.

- 3) Comprar els virus amb els gens necessaris per tal que el virus faci la REPLICACIÓ i la SÍNTESI DE LA CÀPSIDA (plasmidi amb gens Rep i Cap)
- 4) Demanar els *guides* d'ARN que hem dissenyat.
- 5) Demanar enzims (p. Ex. SapI) i altres components per tal que es duguin els acoblaments.
- 6) Fer l'acoblament (*guide*-plasmidi)
 - a. Obrir el plasmidi mitjançant un enzim de restricció (en aquest cas, el SapI)
 - b. Introduir l'ADN que codificarà el gRNA
 - c. Tancar el plasmidi mitjançant una lligasa
- 7) Preparar partícules víriques
 - a. Inserir el plasmidi amb la Cas9, el plasmidi amb el *guide* de l'extrem 5' i el plasmidi amb el *guide* de l'extrem 3' al AAV o bé posar els dos *guides* al mateix plasmidi i la Cas9 a part
- 8) Provar si els components funcionen. Cal fer proves amb els diferents gRNAs per veure si es produeix la tècnica correctament. Ho faríem inserint el virus dins del subjecte a tractar.
 - a. Per proves preliminars, podríem fer l'experiment amb cèl·lules que han de tenir el gen de la huntingtina humana.
 - b. Posteriorment, podríem fer proves amb ratolins portadors de la malaltia per veure si progressen.
 - c. Si tot surt bé (repetint l'experiment moltes vegades i amb diferents variables): el següent pas seria fer un estudi en humans.
- 9) En el cas de les cèl·lules, comprovar si s'ha produït la mutació.

2.6. FUNCIONAMENT TÈCNICA CRISPR

Resumint, el funcionament de la tècnica, una vegada introduïm tots els components dins del subjecte, és el següent:

- 1) El virus amb els components per a la tècnica infecten la cèl·lula.
- 2) El plasmidi que contenia les seqüències gRNAs + scaffolds es transcriurà i el que contenia la seqüència de la proteïna Cas9 es traduirà.
- 3) Aquestes dues molècules s'uniran formant una ribonucleoproteïna.
- 4) Els gRNAs d'aquestes ribonucleoproteïnes es col·locaran a la seqüència d'ADN per a la qual els hem dissenyat.
- 5) La Cas9 tallarà (mitjançant un DBS) entre el 3r i 4^o nucleòtid a dalt (cap a l'extrem 5') del PAM (que ja hem tingut en compte quan hem dissenyat els gRNAs)
- 6) La ribonucleoproteïna se separarà de l'ADN i quedaran la cadena d'ADN que hem tallat i l'original separada en 2 trossos (l'extrem 5' i el 3').

- 7) La cadena original separada, sense la seqüència que hem eliminat, s'unirà, mitjançant el mecanisme de NHEJ.

2.7. TÈCNiques DE VALIDACIÓ

Per tal de verificar si una modificació s'ha realitzat correctament, podem fer diferents tècniques, depenent de què vulguem comprovar.

- 1) Assaig de la nucleasa SURVEYOR: "Aquesta tècnica s'utilitza per trencar la doble cadena d'ADN selectivament que no és coincident. Això permet detectar i estimar la fracció mutada de l'ADN" (Guschin et al., 2010). Aquesta tècnica és útil perquè es pot comparar el resultat obtingut amb les cèl·lules mutades i amb les cèl·lules control. D'aquesta manera podem saber, aproximadament, si la Cas9 ha tallat on havia de fer-ho o si ho ha fet en altres llocs. En el meu cas, aquesta no seria una bona prova ja que la meva mutació és molt gran.
- 2) Seqüenciació. Aquesta és molt usada en aquests casos. Consisteix a identificar quines bases corresponen a una mostra d'ADN però, en una mostra tan gran com la nostra, trigaria molt de temps a realitzar-se de manera que no és la més apropiada. Igualment, es podria fer i comparar amb l'original i així comprovar si la mutació ha estat la correcta. Una tècnica que s'utilitza molt en la tècnica CRISPR és la seqüenciació Sanger. Aquesta consisteix a "copiar l'ADN a analitzar diferents vegades, formant fragments de diferents mides, marcant el final de les cadenes amb una proteïna fluorescent, això ens permet determinar la seqüència" (Khan Academy, n.d.). Aquesta tècnica no ens serveix pel mateix motiu que l'anterior.
- 3) PCR: La PCR (*Polymerase Chain Reaction*) és "una tècnica d'amplificació d'ADN mitjançant la reacció en cadena d'una polimerasa. Bàsicament, es tracta de replicar una vegada i una altra un mateix fragment d'ADN i, per això, hem de realitzar *in vitro* el que fan les cèl·lules *in vivo* per replicar el seu ADN." (UGR (Universitat de Granada), n.d.). Amb aquesta tècnica podríem amplificar la regió de l'ADN per veure si s'ha produït la mutació. Per fer-ho, faríem una PCR de l'ADN sense tractar i una altra de l'ADN problema modificat. Si l'alteració correspon a l'eliminació d'aproximadament 200 bases (poliQ+ gRNAs + espai entre la poliQ

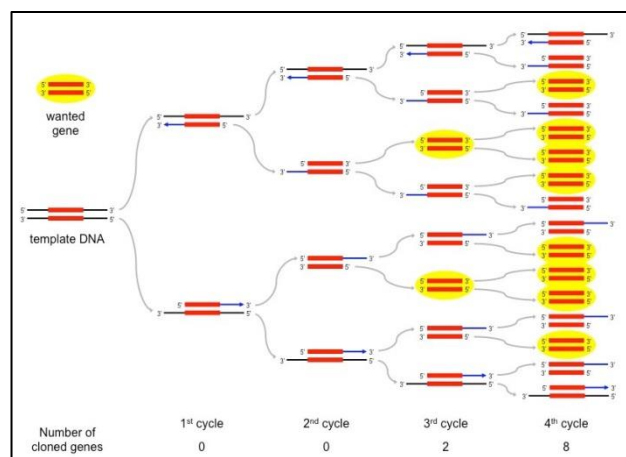


Figura 13 Esquema del funcionament de la PCR. Extret de <http://ib.bioninja.com.au/standard-level/topic-2-molecular-biology/27-dna-replication-transcri/pcr.html>

l'ADN sense tractar i una altra de l'ADN problema modificat. Si l'alteració correspon a l'eliminació d'aproximadament 200 bases (poliQ+ gRNAs + espai entre la poliQ

i primers) + (espai d'entre la mutació dels primers de la PCR (PCR ROI Primers)), després de realitzar la tècnica, al fer una PCR, esperariem obtenir un fragment de 200 bases més petit que l'original. Si trobéssim la mateixa quantitat, és que no s'hauria donat la mutació.

4) Immunofluorescència: “Es una tècnica que s'utilitza per a la detecció d'estructures subcel·lulars que ens permeten estudiar-les amb la utilització d'anticossos acoblats a fluoròfors” (Garcia, n.d.). En el meu cas, podria utilitzar aquesta tècnica per detectar si es segueix sintetitzant la proteïna mutada o altres marcadors a les neurones que indiquin que aquestes cèl·lules es segueixen fent malbé. Durant la meua estada al PCB, vam fer una immunofluorescència per detectar danys a l'ADN, després d'aplicar un possible mutagènic ja que, el procediment és el mateix. La meua experiència, aplicant aquesta tècnica, està recollida dins del blog (practiquesalpcb.wordpress.com).

5) Electroforesi: “És un tècnica molt utilitzada per analitzar i caracteritzar àcids nucleics de diferents procedències. Els gels es comporten com un tamís molecular i permeten separar molècules carregades en funció de la seva grandària i forma. Així, molècules de DNA de diferent grandària es mouran de forma diferent en una electroforesi en gel d'agarosa. A més, si en aquesta electroforesi s'apliquen marcadors de pes molecular (fragments de DNA de grandària coneguda) es pot calcular la grandària aproximada del DNA en estudi” (Padilla Peña,

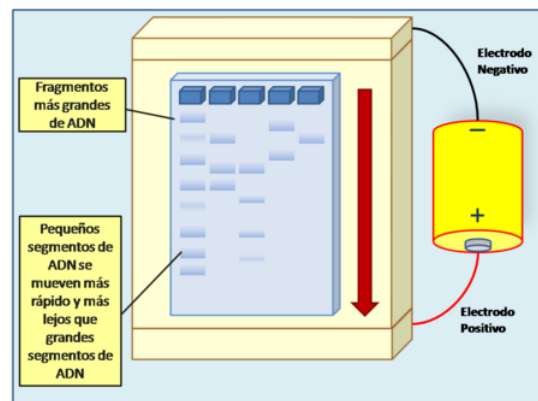


Figura 14 Esquema del funcionament d'una electroforesi. Extret de: <http://angelicaureche23.blogspot.com/2014/10/electroforesis.html>

Diez Dapena, Martínez Galisteo, Bárcena Ruiz, & García Alfonso, n.d.). Com que les molècules més grans es mouen menys i les més lleugeres es mouen més, podem comprovar si hi ha cadenes petites o llargues i, per tant, si s'han produït altres trencaments i si el DSB no s'ha reparat per NHEJ. Podríem aplicar aquesta tècnica o bé a l'ADN extret directament de les cèl·lules o bé a l'ADN amplificat per la PCR.

2.8. DISSENY DE PCR ROI PRIMERS

Per fer la PCR, necessitem uns primers que indiquin on ha de començar i acabar l'amplificació és a dir, seleccionar una regió d'interès (Region Of Interest). També vaig realitzar aquesta part al PCB.

Per fer-ho, vaig seguir aquest protocol:

- 1) Per arribar als *primers*, vaig utilitzar la base de dades del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). Dins del seu web, hi ha un buscador on vaig seleccionar el Genoma com a *data base* i vaig buscar l'humà.
- 2) Una vegada vaig ser dins la pàgina del genoma humà, vaig buscar el cromosoma 4 i vaig clicar a l'enllaç de la seqüència de la Huntingtina.
- 3) Quan ja era dins, vaig utilitzar una eina anomenada *Pick Primers* que es troba a l'apartat d'anàlisi.
- 4) Dins de l'eina, vaig configurar-la per tal que busqués *primers* per la part de l'extrem de 5' i per la part de 3', posant on comença i acaba la seqüència i vaig determinar que la *data base* que utilitzés fos el genoma de l'organisme seleccionat.
- 5) Quan vaig acabar la configuració, vaig seleccionar uns quants primers depenent de la llargària i de la posició.

Els primers seleccionats es troben als resultats.

3. MODIFICACIONS GENÈTIQUES: BIOÈTICA I SOCIETAT

En aquesta part, volia comprovar quina era l'opinió de la societat envers l'ètica de les modificacions genètiques, la selecció embrionària i l'avortament terapèutic. Per fer-ho, vaig crear un formulari amb *Google Forms* que estava dividit en 3 parts:

- 1) A la 1a part, em presentava i demanava dades "personals" als enquestats com: la seva franja d'edat, el seu gènere, la seva professió i si hi havia cap persona propera de la família que havia patit o pateix una malaltia hereditària.
- 2) A la 2a part, explicava, com a introducció, què era una malaltia hereditària (i que no tenen cura) i feia les següents preguntes:
 - a. En el cas que hi hagués una cura per a una malaltia gènica (o hereditària), veuria ètic modificar l'ADN?
 - b. Si una parella en fos afectada i volgués tenir fills, veuria ètica la selecció d'embrions (òvul+espermatozoide)?
 - c. Si una dona embarassada sabés que el seu fill naixerà amb una malaltia hereditària, que no té curació, consideraria legal l'avortament terapèutic?
 - d. Si una parella estigués afectada i volgués tenir fills, veuria ètica la MODIFICACIÓ DELS GENS DE L'embrió?
- 3) A la tercera part, exposava als lectors els riscos de modificar l'ADN i els preguntava si mantenien la seva opinió amb les següents preguntes:
 - a. Sabent això, segueix vostè veient ètica la modificació de gens?
 - b. Sabent això, segueix vostè veient ètica la modificació de gens en EMBRIONS?

RESULTATS

R. 1. ENTREVISTA AL Dr. ESTEBAN MUÑOZ

L'entrevista al Dr. Esteban Muñoz, especialista en la tècnica CRISPR està inclosa en els ANNEXOS/RECOMANACIONS.

Els punts més importants van ser:

- Conèixer una mica la malaltia: edat d'inici, afectació, símptomes
- Tractament actual: Tractament simptomàtic
- Futurs tractaments: Teràpia gènica i teràpia amb oligonucleòtid antisentit.
- La importància del consell gènic per la realització de les proves

Tots aquests apartats estan explicats dins el punt de la Malaltia de Huntington

R. 2. gRNAs

Els primers que vaig dissenyar i adaptar per l'*assembly* van ser els següents: (la lletra és Courier New per tal que les lletres tinguin la mateixa amplada i es pugui comparar millor).

El model que vaig seguir per fer l'adaptació és el del tall de l'enzim de restricció SapI. Aquest talla quan troba la següent seqüència:

```
SENSE ADAPTAR: 5' gaaac accggaagagcgagctcttct gttttaga 3'
                  |         |
                  |         |
3' ctttg tggccttctcgctcgagaaga caa aatct 5'
```

```
PER ADAPTAR: 5' gaaac accggaagagcgagctcttct gttttaga 3'
                  |         |
                  |         |
3' ctttg tggccttctcgctcgagaaga caa aatct 5'
```

```
ADAPTACIÓ: 5' acc---GUIDE---
              |         |
              |         |
3' ---GUIDE--- caa
```

- *Assemblies* amb SpCas9:

- Assembly #1

- Sp1 FW 5' TTCATTGCCCGGTGCTGAG 3'
- Sp1 RV 3' AAGTAACGGGGCCACGACTC 5'

- Sp1-adapted FW 5' accTTCATTGCCCGGTGCTGAG 3'
- Sp1-adapted RV 3' AAGTAACGGGGCCACGACTCcaa 5'

- Assembly #2
 - Sp2 FW 5' GAGTCGGCCCCGAGGCCTCCG 3'
 - Sp2 RV 3' CTCAGCCGGGCTCCGGAGGC 5'

 - Sp2-adapted FW 5' **acc**GAGTCGGCCCCGAGGCCTCCG 3'
 - Sp2-adapted RV 3' CTCAGCCGGGCTCCGGAGGC**caa** 5'

- Assembly #3
 - Sp3 FW 5' GAAGGACTTGAGGGACTCGA 3'
 - Sp3 RV 3' CTCCTGAACTCCCTGAGCT 5'

 - Sp3-adapted FW 5' **acc**GAAGGACTTGAGGGACTCGA 3'
 - Sp3-adapted RV 3' CTCCTGAACTCCCTGAGCT**caa** 5'

- Assembly #4
 - Sp4 FW 5' agcagcggctgtgcctgcgg 3'
 - Sp4 RV 3' tcgtcgccgacacggacgcc 5'

 - Sp4-adapted FW 5' **acc**agcagcggctgtgcctgcgg 3'
 - Sp4-adapted RV 3' tcgtcgccgacacggacgcc**caa** 5'

- Assembly #5
 - Sp5 FW 5' TCAGCCACAGCcgggccggg 3'
 - Sp5 RV 3' AGTCGGTGTGgccccggccc 5'

 - Sp5-adapted FW 5' **acc**TCAGCCACAGCcgggccggg 3'
 - Sp5-adapted RV 3' AGTCGGTGTGgccccggccc**caa** 5'

- Assembly #6
 - Sp6 FW 5' AGCGGGCCCAAACCTCACGGT 3'
 - Sp6 RV 3' TCGCCCGGGTTTGAGTGCCA 5'

 - Sp6-adapted FW 5' **acc**AGCGGGCCCAAACCTCACGGT 3'
 - Sp6-adapted RV 3' TCGCCCGGGTTTGAGTGCCA**caa** 5'

- *Assemblies amb SaCas9:*
 - Assembly #1
 - Sa1 FW 5' GGAAAAGCTGATGAAGGCCT 3'
 - Sa1 RV 3' CCTTTTCGACTACTTCCGGA 5'

- Sa1-adapted FW 5' **acc**GGAAAAGCTGATGAAGGCCT 3'
- Sa1-adapted RV 3' CCTTTTCGACTACTTCCGG**aaa** 5'

– Assembly #2

- Sa2 FW 5' GTCCTCAGCCACAGCcggg 3'
- Sa2 RV 3' CGAGGAGTCGGTGTTCGgccc 5'

- Sa2-adapted 5' **acc**GTCCTCAGCCACAGCcggg 3'
- Sa2-adapted 3' CGAGGAGTCGGTGTTCGgccc**aaa** 5'

En els *assemblies* de la SpCas9, els tres primers corresponen als situats a l'extrem 5' de la mutació i els tres següents corresponen als situats a l'extrem 3'.

En el cas de la SaCas9, com que té una PAM més complexa, només hi havia 2 possibles gRNAs. El primer correspon al del costat 5' i el segon, al del costat 3'.

Els plasmidis amb els *guides* es troben en la següent carpeta de *Google Drive* juntament amb el gen de la huntingtina i els *primers*: <https://goo.gl/WXWnzt>. Com podem veure als plasmids, els guides són entre el promotor i el gRNA scaffold.

R. 3. PCR ROI Primers

Els PCR ROI primers que vaig escollir són els següents:

- Amb la SpCas9:
 - Extrem 5': GTTCTGCTTTTACCTGCGGC
 - Extrem 3': GAAGACCCAAGTGAGGGAGC
- Amb la SaCas9
 - Extrem 5': GCGAGAGGACAAGGGAAGAC
 - Extrem 3': GGTTCGCTTTTACCTGCGG

Com es pot veure a la seqüència del gen de la huntingtina a l'enllaç anterior, els PCR ROI *primers* estan situats abans del 1r gRNA i després de l'últim

R. 4. ENQUESTES

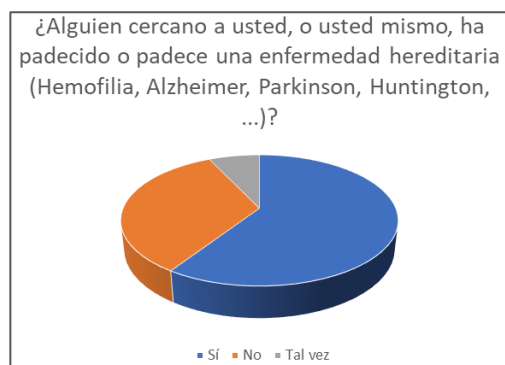
Vaig rebre un total de 427 respostes (el dia 21/10/18, que és quan vaig treure l'anàlisi) en les quals hi ha tot tipus de respostes.

He agrupat les respostes per preguntes i les he sotmès a diferents variables com: l'edat, si tenen o no un familiar afectat per una malaltia hereditària, ...

La pregunta important de la primera part era si la persona enquestada coneixia alguna persona afectada per una malaltia genètica.

Etiquetas de fila	Respuestas
No	253
Sí	144
Tal vez	30
Total general	427

Taula 4 Respostes de la pregunta: “¿Alguien cercano a usted, o usted mismo, ha padecido o padece una enfermedad hereditaria (Hemofilia, Alzheimer, Parkinson, Huntington, ...)?”



Gràfic 1 Respostes de la pregunta: “¿Alguien cercano a usted, o usted mismo, ha padecido o padece una enfermedad hereditaria (Hemofilia, Alzheimer, Parkinson, Huntington, ...)?”

La primera pregunta de la segona part era: “en el cas que hi hagués una cura per una malaltia genètica, veuria ètic modificar l'ADN?”. En aquest cas, vaig obtenir les següents dades:

Etiquetas de fila	Resultats
Depende de la enfermedad	1
en mi opinión, no se trata de ética, sino de cambiar la propia naturaleza	1
Me falta información	1
Necesaría tener datos sobre todas las posibles consecuencias	1
No	27
Prefiero no contestar	3
Sí	297
si, siempre que hi pogues accedir tot tipus de població, sense tenir en compte origen ni ingressos	1
Tal vez	95
Total general	427

Taula 5. Resultats de la pregunta: “En el caso de que hubiera una cura para una enfermedad genética (o hereditaria), ¿vería ético modificar el ADN?”



Gràfic 2 Resultats de la pregunta: “En el caso de que hubiera una cura para una enfermedad genética (o hereditaria), ¿vería ético modificar el ADN?”

En aquest cas, vaig trobar interessant classificar les respostes primerament, per edats i després, segons si coneixien alguna persona amb una malaltia genètica. Els resultats van ser els següents:

¿vería ético modificar el ADN?	Edades								Total general
	12-17	18-25	26-35	36-40	41-45	46-55	56-65	>65	
Depende de la enfermedad							1		1
en mi opinión, no se trata de ética, sino de cambiar la propia naturaleza				1					1
Me falta información						1			1

Necesitaría tener datos sobre todas las posibles consecuencias								1	1
No	10	2	1	1	4	4	5		27
Prefiero no contestar	1			1	1				3
Sí	36	33	20	15	49	93	47	4	297
si, sempre que hi pogues accedir tot tipus de població, sense tenir en compte origen ni ingressos							1		1
Tal vez	18	9	5	4	19	23	17		95
Total general	65	44	26	22	73	122	71	4	427

Taula 6 Respostes de la pregunta: "En el caso de que hubiera una cura para una enfermedad genética (o hereditaria), ¿vería ético modificar el ADN?" clasificades per franges d'edat

Les persones que **si** coneixien a algú que pateix/ va patir una malaltia genètica van contestar el següent:

¿vería ético modificar el ADN?	Edades								Total general
	12-17	18-25	26-35	36-40	41-45	46-55	56-65	>65	
Etiquetas de fila									
en mi opinión, no se trata de ética, sino de cambiar la propia naturaleza				1					1
No	2				1		2		5
Prefiero no contestar	1			1					2
Sí	7	14	12	5	18	35	17	2	110
Tal vez	2	2	2	2	6	6	6		26
Total general	12	16	14	9	25	41	25	2	144

Taula 7 Respostes de la pregunta "En el caso de que hubiera una cura para una enfermedad genética (o hereditaria), ¿vería ético modificar el ADN?" que van contestar Sí a la primera pregunta clasificades per franges d'edat

Les persones que **no** coneixien a algú que pateix/ va patir una malaltia genètica van contestar el següent:

¿vería ético modificar el ADN?	Edades								Total general
	12-17	18-25	26-35	36-40	41-45	46-55	56-65	>65	
Etiquetas de fila									
Depende de la enfermedad							1		1
Me falta información						1			1
Necesitaría tener datos sobre todas las posibles consecuencias							1		1
No	6	2	1	1	3	4	3		20
Prefiero no contestar					1				1
Sí	24	16	7	9	28	54	25	2	165
si, siempre que hi pogues accedir tot tipus de població, sense tenir en compte origen ni ingressos							1		1
Tal vez	15	5	3	2	13	16	9		63
Total general	45	23	11	12	45	76	39	2	253

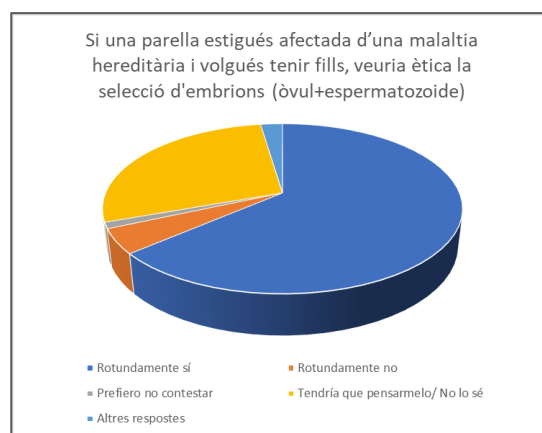
Taula 8 Respostes de la pregunta "En el caso de que hubiera una cura para una enfermedad genética (o hereditaria), ¿vería ético modificar el ADN?" que van contestar NO a la primera pregunta clasificades per franges d'edat

Les persones que **pot ser** coneixien a algú que pateix/ va patir una malaltia genètica van contestar el següent:

¿vería ético modificar el ADN?	Edades							Total general
	12-17	18-25	26-35	36-40	41-45	46-55	56-65	
No	2							2
Sí	5	3	1	1	3	4	5	22
Tal vez	1	2				1	2	6
Total general	8	5	1	1	3	5	7	30

Taula 9 Respostes de la pregunta "En el caso de que hubiera una cura para una enfermedad genética (o hereditaria), ¿vería ético modificar el ADN?" que van contestar POT SER a la primera pregunta classificades per franges d'edat

La següent pregunta era: "Si una pareja estigués afectada d'una malaltia hereditària i volgués tenir fills, veuria ètica la selecció d'embrions (òvul+espermatozoide)? Vaig seguir la mateixa estructura del resultats que l'anterior:



Gràfic 3 Respostes de la pregunta: "Si una pareja estuviera afectada y quisiera tener hijos, ¿vería ética la selección de embriones (óvulo+espermatozoide)?"

Etiquetas de fila	Respostes
Depende de la afectación	1
Depende de la enfermedad	1
no juzgo la decisión que tomase la pareja. Creo que la opción que elijan sería válida para ellos en cualquier caso	1
Prefiero no contestar	5
Puedes tener hijos adoptados. Aún no tengo claro, y las consecuencias que puede tener la manipulación genética.	1
Rotundamente no	20
Rotundamente sí	272
Segun caso y tras estudio SI	1
Segun la enfermedad	1
Si	2
Si molt probablement..., pero sense el "rotundament"	1
Solamente en caso de enfermedades graves que pudiesen afectar seriamente la vida de la persona y disminuir mucho su calidad de vida	1
Tendría que pensarmelo/ No lo sé	120
Total general	427

Taula 10 Respostes de la pregunta: "Si una pareja estuviera afectada y quisiera tener hijos, ¿vería ética la selección de embriones (óvulo+espermatozoide)?"

Els resultats classificats per franges d'edats estan inclosos en la següent taula:

¿vería ética la selección de embriones?	Edad								Total general
	12-17	18-25	26-35	36-40	41-45	46-55	56-65	>65	
Depende de la afectación							1		1
Depende de la enfermedad						1			1
no juzgo la decisión que tomase la pareja. Creo que la opción que elijan sería válida para ellos en cualquier caso				1					1
Prefiero no contestar	3					2			5
Puedes tener hijos adoptados. Aún no tengo claro, y las consecuencias que puede tener la manipulación genética.						1			1
Rotundamente no	6	1		2	2	6	3		20
Rotundamente sí	27	27	18	15	54	73	55	3	272
Segun caso y tras estudio SI						1			1
Segun la enfermedad					1				1
Si						2			2
Si molt probablement..., pero sense el "rotundament"				1					1
Solamente en caso de enfermedades graves que pudiesen afectar seriamente la vida de la persona y disminuir mucho su calidad de vida			1						1
Tendría que pensarmelo/ No lo sé	29	15	8	3	16	36	12	1	120
Total general	65	44	26	22	73	122	71	4	427

Taula 11 Respostes de la pregunta: "Si una pareja estuviera afectada y quisiera tener hijos, ¿vería ética la selección de embriones (óvulo+espermatozoide)?" clasificades per franges d'edat

Les persones que **si** coneixien a algú que pateix/ va patir una malaltia genètica van contestar el següent:

¿vería ética la selección de embriones?	Edad								Total general
	12-17	18-25	26-35	36-40	41-45	46-55	56-65	>65	
no juzgo la decisión que tomase la pareja. Creo que la opción que elijan sería válida para ellos en cualquier caso				1					1
Prefiero no contestar	1					1			2
Rotundamente no	2					1	2		5
Rotundamente sí	4	11	13	6	21	26	19	2	102
Segun la enfermedad					1				1
Si molt probablement..., pero sense el "rotundament"				1					1
Tendría que pensarmelo/ No lo sé	5	5	1	1	3	13	4		32
Total general	12	16	14	9	25	41	25	2	144

Taula 12 Respostes de la pregunta "Si una pareja estuviera afectada y quisiera tener hijos, ¿vería ética la selección de embriones (óvulo+espermatozoide)?" dels que van contestar Sí a la primera pregunta

Les persones que **no** coneixien a algú que pateix/ va patir una malaltia genètica van contestar el següent:

¿vería ética la selección de embriones?	Edad								Total general
	12-17	18-25	26-35	36-40	41-45	46-55	56-65	>65	
Depende de la afectación							1		1
Depende de la enfermedad						1			1
Prefiero no contestar		1							1
Puedes tener hijos adoptados. Aún no tengo claro, y las consecuencias que puede tener la manipulación genética.						1			1
Rotundamente no	4	1		2	2	5	1		15
Rotundamente sí	19	14	4	8	31	43	31	1	151
Segun caso y tras estudio SI						1			1
Si						2			2
Solamente en caso de enfermedades graves que pudiesen afectar seriamente la vida de la persona y disminuir mucho su calidad de vida			1						1
Tendría que pensarmelo/ No lo sé	21	7	7	2	12	23	6	1	79
Total general	45	23	11	12	45	76	39	2	253

Taula 13 Respostes de la pregunta "Si una pareja estuviera afectada y quisiera tener hijos, ¿vería ética la selección de embriones (óvulo+espermatozoide)?" dels que van contestar NO a la primera pregunta

Les persones que **pot ser** coneixien a algú que pateix/ va patir una malaltia genètica van contestar el següent:

¿vería ética la selección de embriones?	Edad							Total general
	12-17	18-25	26-35	36-40	41-45	46-55	56-65	
Prefiero no contestar		1					1	2
Rotundamente sí	4	2	1	1	2	4	5	19
Tendría que pensarmelo/ No lo sé	3	3			1		2	9
Total general	8	5	1	1	3	5	7	30

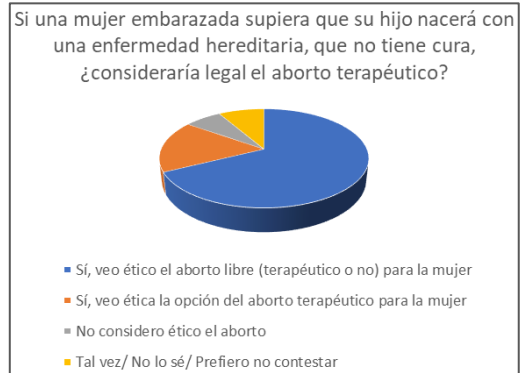
Taula 14 Respostes de la pregunta "Si una pareja estuviera afectada y quisiera tener hijos, ¿vería ética la selección de embriones (óvulo+espermatozoide)?" dels que van contestar POT SER a la primera pregunta

La 3a pregunta era: "Si una dona embarassada sabés que el seu fill naixerà amb una malaltia hereditària, que no té curació, consideraria legal l'avortament terapèutic?"

Els resultats generals van ser:

Etiquetas de fila	Resultados
No considero ético el aborto	29
Sí, veo ética la opción del aborto terapéutico para la mujer	73
Sí, veo ético el aborto libre (terapéutico o no) para la mujer	289
Tal vez/ No lo sé/ Prefiero no contestar	36
Total general	427

Taula 15 Respostes de la pregunta: "Si una mujer embarazada supiera que su hijo nacerá con una enfermedad hereditaria, que no tiene cura, ¿consideraría legal el aborto terapéutico?"



Gràfic 4 Respostes de la pregunta: "Si una mujer embarazada supiera que su hijo nacerá con una enfermedad hereditaria, que no tiene cura, ¿consideraría legal el aborto terapéutico?"

Els resultats agrupats per edats són els següents:

¿consideraría legal el aborto terapéutico?	Edad								Total general
	12-17	18-25	26-35	36-40	41-45	46-55	56-65	>65	
No considero ético el aborto	9	4	1	2	2	6	5		29
Sí, veo ética la opción del aborto terapéutico para la mujer	7	9	5	4	15	15	16	2	73
Sí, veo ético el aborto libre (terapéutico o no) para la mujer	39	27	17	14	49	94	47	2	289
Tal vez/ No lo sé/ Prefiero no contestar	10	4	3	2	7	7	3		36
Total general	65	44	26	22	73	122	71	4	427

Gràfic 5 Respostes de la pregunta: "Si una mujer embarazada supiera que su hijo nacerá con una enfermedad hereditaria, que no tiene cura, ¿consideraría legal el aborto terapéutico?" clasificades per franges d'edat

Les persones que **si** coneixien a algú que pateix/ va patir una malaltia genètica van contestar el següent:

¿consideraría legal el aborto terapéutico?	Edad								Total general
	12-17	18-25	26-35	36-40	41-45	46-55	56-65	>65	
No considero ético el aborto	1			1		1	2		5
Sí, veo ética la opción del aborto terapéutico para la mujer	1	3	3	3	4	3	5	1	23
Sí, veo ético el aborto libre (terapéutico o no) para la mujer	9	13	11	4	18	35	17	1	108
Tal vez/ No lo sé/ Prefiero no contestar	1			1	3	2	1		8
Total general	12	16	14	9	25	41	25	2	144

Taula 16 Respostes de la pregunta "Si una mujer embarazada supiera que su hijo nacerá con una enfermedad hereditaria que no tiene cura, ¿consideraría legal el aborto terapéutico?" dels que van contestar Sí a la primera pregunta

Les persones que **no** coneixien a algú que pateix/ va patir una malaltia genètica van contestar el següent:

¿consideraría legal el aborto terapéutico?	Edad								Total general
	12-17	18-25	26-35	36-40	41-45	46-55	56-65	>65	
No considero ético el aborto	7	3	1	1	2	4	3		21
Sí, veo ética la opción del aborto terapéutico para la mujer	5	5	2	1	10	12	9	1	45
Sí, veo ético el aborto libre (terapéutico o no) para la mujer	24	12	5	9	29	55	27	1	162
Tal vez/ No lo sé/ Prefiero no contestar	9	3	3	1	4	5			25
Total general	45	23	11	12	45	76	39	2	253

Taula 17 Respostes de la pregunta "Si una mujer embarazada supiera que su hijo nacerá con una enfermedad hereditaria que no tiene cura, ¿consideraría legal el aborto terapéutico?" dels que van contestar NO a la primera pregunta

Les persones que **pot ser** coneixien a algú que pateix/ va patir una malaltia genètica van contestar el següent:

¿consideraría legal el aborto terapéutico?	Edad								Total general
	12-17	18-25	26-35	36-40	41-45	46-55	56-65	>65	
No considero ético el aborto	1	1					1		3
Sí, veo ética la opción del aborto terapéutico para la mujer	1	1			1		2		5
Sí, veo ético el aborto libre (terapéutico o no) para la mujer	6	2	1	1	2	4	3		19
Tal vez/ No lo sé/ Prefiero no contestar		1					2		3
Total general	8	5	1	1	3	5	7		30

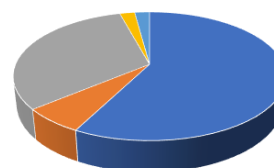
Taula 18 Respostes de la pregunta "Si una mujer embarazada supiera que su hijo nacerá con una enfermedad hereditaria que no tiene cura, ¿consideraría legal el aborto terapéutico?" dels que van contestar POT SER a la primera pregunta

La darrera pregunta de la segona part de la enquesta era: "Si una parella estigués afectada i volgués tenir fills, veuria ètica la MODIFICACIÓ DELS GENS DE L'embrió?"

La resposta general va ser:

Etiquetas de fila	Resultados
adoptar. Barriga de alquiler	1
Depende de la afectación	1
hi ha a ltres mètodes per ser pares	1
no juzgo la decisión. lo que decida esa pareja será válido para ellos	1
Prefiero no contestar	9
Rotundamente no	27
Rotundamente sí	246
Segun caso y tras estudio	1
Si	2
Si és per evitar l'herència d'una enfermetat o la possible deformació del feto si, si és per un bebe a la carta NO.	1
Solamente en casos muy graves	1
Tendría que pensarmelo/ No lo sé	136
Total general	427

Si una pareja estuviera afectada y quisiera tener hijos, ¿vería ética la MODIFICACIÓN DE LOS GENES DEL embrión?



Gràfic 6 Respostes de la pregunta: "Si una pareja estuviera afectada y quisiera tener hijos, ¿vería ética la MODIFICACIÓN DE LOS GENES DEL embrión?"

Taula 19 Resultats de la pregunta: " Si una pareja estuviera afectada y quisiera tener hijos, ¿vería ética la MODIFICACIÓN DE LOS GENES DEL embrión? "

Les respostes segons la franja d'edat estan representades en la següent taula:

¿vería ética la MODIFICACIÓN DE LOS GENES DEL embrión?	Edad								Total general	
	12-17	18-25	26-35	36-40	41-45	46-55	56-65	>65		
adoptar. Barriga de alquiler							1		1	
Depende de la afectación							1		1	
hi ha a ltres mètodes per ser pares						1			1	
no juzgo la decisión. lo que decida esa pareja será válido para ellos				1					1	
Prefiero no contestar		4	1		1	2	1		9	
Rotundamente no		7	4	1	2	5	3	5	27	
Rotundamente sí		27	22	16	10	53	75	40	3	246
Segun caso y tras estudio							1		1	
Si							2		2	
Si és per evitar l'herència d'una enfermetat o la possible deformació del feto si, si és per un bebe a la carta NO.				1					1	
Solamente en casos muy graves			1						1	
Tendría que pensarmelo/ No lo sé	27	17	8	8	14	38	23	1	136	
Total general	65	44	26	22	73	122	71	4	427	

Taula 20 Respostes de la pregunta: "Si una pareja estuviera afectada y quisiera tener hijos, ¿vería ética la MODIFICACIÓN DE LOS GENES DEL embrión?" classificades per franges d'edat

Les persones que sí coneixien a algú que pateix/ va patir una malaltia genètica van contestar el següent:

¿vería ética la MODIFICACIÓN DE LOS GENES DEL embrión?	Edad
--	------

Etiquetas de fila	12-	18-	26-	36-	41-	46-	56-	>65	Total general
	17	25	35	40	45	55	65		
no juzgo la decisión. lo que decida esa pareja será válido para ellos					1				1
Prefiero no contestar							1		1
Rotundamente no	1			1	2	1	2		7
Rotundamente sí	8	9	11	3	21	26	12	2	92
Si és per evitar l'herència d'una enfermetat o la possible deformació del feto si, si és per un bebe a la carta NO.				1					1
Tendría que pensarmelo/ No lo sé	3	7	3	3	2	14	10		42
Total general	12	16	14	9	25	41	25	2	144

Taula 21 Respostes de la pregunta: "Si una pareja estuviera afectada y quisiera tener hijos, ¿vería ética la MODIFICACIÓN DE LOS GENES DEL embrión?" dels que havien contestat SÍ en la primera pregunta classificades per franges d'edat

Les persones que **no** coneixien a algú que pateix/ va patir una malaltia genètica van contestar el següent:

Etiquetas de fila	Edad								Total general
	12-17	18-25	26-35	36-40	41-45	46-55	56-65	>65	
adoptar. Barriga de alquiler							1		1
Depende de la afectación							1		1
hi ha a ltres mètodes per ser pares						1			1
Prefiero no contestar	3		1		1	1			6
Rotundamente no	6	4	1	1	3	2	3		20
Rotundamente sí	16	12	4	6	30	45	24	1	138
Segun caso y tras estudio						1			1
Si						2			2
Solamente en casos muy graves		1							1
Tendría que pensarmelo/ No lo sé	20	6	5	5	11	24	10	1	82
Total general	45	23	11	12	45	76	39	2	253

Taula 22 Respostes de la pregunta: "Si una pareja estuviera afectada y quisiera tener hijos, ¿vería ética la MODIFICACIÓN DE LOS GENES DEL embrión?" dels que havien contestat NO en la primera pregunta classificades per franges d'edat

Les persones que **pot ser** coneixien a algú que pateix/ va patir una malaltia genètica van contestar el següent:

Etiquetas de fila	Edad								Total general
	12-17	18-25	26-35	36-40	41-45	46-55	56-65	>65	
Prefiero no contestar	1					1			2
Rotundamente sí	3	1	1	1	2	4	4		16
Tendría que pensarmelo/ No lo sé	4	4			1		3		12
Total general	8	5	1	1	3	5	7		30

Taula 23 Respostes de la pregunta: "Si una pareja estuviera afectada y quisiera tener hijos, ¿vería ética la MODIFICACIÓN DE LOS GENES DEL embrión?" dels que havien contestat POT SER en la primera pregunta classificades per franges d'edat

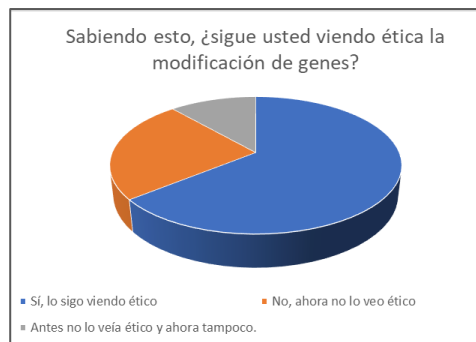
En la segona part, l'enquestat rebia informació sobre els possibles efectes adversos d'una modificació genètica. Per aquest motiu m'ha semblat interessant comparar els resultats d'abans i després de saber-ho.

La primera pregunta d'aquest tercer apartat era: "Sabent això, segueix vostè veient ètica la modificació de gens?" .

Els resultats generals van ser:

Etiquetas de fila	Resultat
Antes no lo veía ético y ahora tampoco.	49
No, ahora no lo veo ético	104
Sí, lo sigo viendo ético	274
Total general	427

Taula 24 Respostes de la pregunta: "Sabendo esto, ¿sigue usted viendo ética la modificación de genes?"



Gràfic 7 Respostes de la pregunta: "Sabendo esto, ¿sigue usted viendo ética la modificación de genes?"

Els resultats agrupats per edats són aquests:

Cuenta de Sabiendo esto, ¿sigue usted viendo ética la modificación de genes?	Edad								Total general	
	12-17	18-25	26-35	36-40	41-45	46-55	56-65	>65		
Antes no lo veía ético y ahora tampoco.		9	5	3	4	5	12	10	1	49
No, ahora no lo veo ético		15	11	4	3	25	33	13		104
Sí, lo sigo viendo ético		41	28	19	15	43	77	48	3	274
Total general		65	44	26	22	73	122	71	4	427

Taula 25 Respostes de la pregunta: "Sabendo esto, ¿sigue usted viendo ética la modificación de genes?" classificades per franges d'edat

En la següent taula es mostren els resultats dels enquestats que havien contestar Sí en la 1a pregunta de la 2a part:

Cuenta de Sabiendo esto, ¿sigue usted viendo ética la modificación de genes?	Edad								Total general	
	12-17	18-25	26-35	36-40	41-45	46-55	56-65	>65		
Antes no lo veía ético y ahora tampoco.		1					1		1	3
No, ahora no lo veo ético		9	8	3	3	14	21	7		65
Sí, lo sigo viendo ético		26	25	17	12	35	71	40	3	229
Total general		36	33	20	15	49	93	47	4	297

Taula 26 Respostes de la pregunta: "Sabendo esto, ¿sigue usted viendo ética la modificación de genes?" dels que van contestar Sí a la mateixa pregunta abans de la informació classificades per edat

En la següent taula es mostren els resultats dels enquestats que havien contestar NO en la 1a pregunta de la 2a part:

Cuenta de Sabiendo esto, ¿sigue usted viendo ética la modificación de genes?	Edad							Total general
	12-17	18-25	26-35	36-40	41-45	46-55	56-65	
Etiquetas de fila								
Antes no lo veía ético y ahora tampoco.	5	2	1	1	1	3	5	18
No, ahora no lo veo ético	1				2	1		4
Sí, lo sigo viendo ético	4				1			5
Total general	10	2	1	1	4	4	5	27

Taula 27 Respostes de la pregunta: "Sabiendo esto, ¿sigue usted viendo ética la modificación de genes?" dels que van contestar NO a la mateixa pregunta abans de la informació classificades per edat

En la següent taula es mostren els resultats dels enquestats que havien contestar POT SER en la 1a pregunta de la 2a part:

Cuenta de Sabiendo esto, ¿sigue usted viendo ética la modificación de genes?	Edad							Total general
	12-17	18-25	26-35	36-40	41-45	46-55	56-65	
Etiquetas de fila								
Antes no lo veía ético y ahora tampoco.	3	3	2	1	3	7	5	24
No, ahora no lo veo ético	5	3	1		9	11	5	34
Sí, lo sigo viendo ético	10	3	2	3	7	5	7	37
Total general	18	9	5	4	19	23	17	95

Taula 28 Respostes de la pregunta: "Sabiendo esto, ¿sigue usted viendo ética la modificación de genes?" dels que van contestar POT SER a la mateixa pregunta abans de la informació classificades per edat

En la següent taula es mostren els resultats dels enquestats que havien contestar una altra resposta diferent a sí, no o pot ser en la 1a pregunta de la 2a part:

Cuenta de Sabiendo esto, ¿sigue usted viendo ética la modificación de genes?	Edad					Total general
	12-17	36-40	41-45	46-55	56-65	
Etiquetas de fila						
Antes no lo veía ético y ahora tampoco.		2	1	1		4
No, ahora no lo veo ético					1	1
Sí, lo sigo viendo ético		1		1	1	3
Total general		1	2	1	2	8

Taula 29 Respostes de la pregunta: "Sabiendo esto, ¿sigue usted viendo ética la modificación de genes?" dels que van contestar ALTRES RESPOTES a la mateixa pregunta abans de la informació classificades per edat

Igual que en l'anterior, l'última pregunta preguntava al lector si canviava d'opinió després de saber que es podien donar alteracions indesitjades. La pregunta era: "Sabent això, segueix vostè veient ètica la modificació de gens en EMBRIONES?" i les respostes generals van ser:

Etiquetas de fila	Resultat
Antes no lo veía ético y ahora tampoco.	66
No, ahora no lo veo ético	111
Sí, lo sigo viendo ético	250
Total general	427

Taula 30 Respostes de la pregunta: "Sabiendo esto, ¿sigue usted viendo ética la modificación de genes en EMBRIONES?"



Gràfic 8 Respostes de la pregunta: "Sabiendo esto, ¿sigue usted viendo ética la modificación de genes en EMBRIONES?"

Els resultats agrupats per edat són els següents:

Cuenta de Sabiendo esto, ¿sigue usted viendo ética la modificación de genes en EMBRIONES?	Edad								Total general
	12-17	18-25	26-35	36-40	41-45	46-55	56-65	>65	
Etiquetas de fila									
Antes no lo veía ético y ahora tampoco.	15	7	3	4	7	15	14	1	66
No, ahora no lo veo ético	22	11	6	3	24	33	12		111
Sí, lo sigo viendo ético	28	26	17	15	42	74	45	3	250
Total general	65	44	26	22	73	122	71	4	427

Taula 31 Respostes de la pregunta: "Sabendo esto, sigue usted viendo ética la modificación de genes en EMBRIONES?" clasificades per franges d'edat

En la següent taula es mostren els resultats dels enquestats que havien contestar Sí modificarien els gens d'un embrió:

Cuenta de Sabiendo esto, ¿sigue usted viendo ética la modificación de genes en EMBRIONES?	Edad								Total general
	12-17	18-25	26-35	36-40	41-45	46-55	56-65	>65	
Etiquetas de fila									
Antes no lo veía ético y ahora tampoco.		1							1
No, ahora no lo veo ético	7	5	2	2	13	16	6		51
Sí, lo sigo viendo ético	20	16	14	8	40	59	34	3	194
Total general	27	22	16	10	53	75	40	3	246

Taula 32 Respostes de la pregunta: "Sabendo esto, sigue usted viendo ética la modificación de genes en EMBRIONES?" dels que van contestar Sí a la mateixa pregunta abans de la informació classificades per edat

En la següent taula es mostren els resultats dels enquestats que havien contestar NO modificarien els gens d'un embrió:

Cuenta de Sabiendo esto, ¿sigue usted viendo ética la modificación de genes en EMBRIONES?	Edad								Total general
	12-17	18-25	26-35	36-40	41-45	46-55	56-65	>65	
Etiquetas de fila									
Antes no lo veía ético y ahora tampoco.	5	2	1	2	3	3	5		21
No, ahora no lo veo ético	2	1			2				5
Sí, lo sigo viendo ético		1							1
Total general	7	4	1	2	5	3	5		27

Taula 33 Respostes de la pregunta: "Sabendo esto, sigue usted viendo ética la modificación de genes en EMBRIONES?" dels que van contestar NO a la mateixa pregunta abans de la informació classificades per edat

En la següent taula es mostren els resultats dels enquestats que havien contestar M'HO HAURIA DE PENSAR/ NO HO SE SI modificarien els gens d'un embrió:

Cuenta de Sabiendo esto, ¿sigue usted viendo ética la modificación de genes en EMBRIONES?	Edad								Total general
	12-17	18-25	26-35	36-40	41-45	46-55	56-65	>65	
Etiquetas de fila									
Antes no lo veía ético y ahora tampoco.	10	4	2	1	3	10	7	1	38
No, ahora no lo veo ético	10	5	3	1	9	16	6		50
Sí, lo sigo viendo ético	7	8	3	6	2	12	10		48
Total general	27	17	8	8	14	38	23	1	136

Taula 34 Respostes de la pregunta: "Sabido esto, sigue usted viendo ética la modificación de genes en EMBRIONES?" dels que van contestar M'HO HAURIA DE PENSAR/ NO HO SE a la mateixa pregunta abans de la informació classificades per edat

Per finalitzar, en la següent taula es mostren els resultats dels enquestats que havien contestat respostes diferents a si, no, hauria de pensar-ho/no sé a si modificarien els gens d'un embrió:

Cuenta de Sabiendo esto, ¿sigue usted viendo ética la modificación de genes en EMBRIONES?	Edad							Total general	
	12-17	18-25	26-35	36-40	41-45	46-55	56-65		
Etiquetas de fila									
Antes no lo veía ético y ahora tampoco.					1	1	2	2	6
No, ahora no lo veo ético		3		1			1		5
Sí, lo sigo viendo ético		1	1		1		3	1	7
Total general	4	1	1	2	1	6	3	18	

Taula 35 Respostes de la pregunta: "Sabido esto, sigue usted viendo ética la modificación de genes en EMBRIONES?" dels que van contestar ALTRES RESPOSTES a la mateixa pregunta abans de la informació classificades per edat

R. 5. ANÀLISI DELS RESULTATS

En aquest apartat, faré un anàlisi dels resultats i en trauré conclusions.

Primerament, l'entrevista al Dr. Esteban Muñoz va ser de gran utilitat ja que va confirmar els meus coneixements estudiats i va afegir més informació sobre el tractament de la Malaltia de Huntington.

En segon lloc, els gRNAs que vaig obtenir amb el programa Benchling, demostren que he entès la tècnica i he après a utilitzar-la.

En darrer lloc, els resultats obtinguts de l'enquesta són els següents. He pogut observar que, no la majoria, però bastanta gent coneix algú que pateix una malaltia genètica i això ha influït, en un cert seu grau, a les respostes obtingudes.

En primer lloc, a la primera pregunta, la gran majoria veia ètica la modificació de l'ADN (297/427 respostes van ser SI mentre que 27/427 van ser NO). D'altra banda, sobretot en aquesta pregunta, s'observa una gran quantitat de persones que no tenen una opinió ferma ja que 95/427 persones han contestat POTSER. En comparar-ho amb la primera pregunta, m'he adonat que aquells que no coneixen ningú afectat són més propensos a no tenir una opinió formada.

A la segona pregunta, la majoria d'enquestats van contestar que sí veuen legal la selecció d'embrions (272 van contestar que sí mentre que 20 que van contestar que no). D'altra banda, i igual que a l'anterior pregunta, hi ha bastant gent que no té una opinió formada (120/427). En aquest cas, es pot observar que els que no coneixen algú afectat, són la majoria dels que han contestat no.

A la tercera pregunta, es demana l'opinió sobre l'avortament en cas de malaltia genètica. Els resultats han estat que la majoria van contestar que veien correcte l'avortament lliure (terapèutic o no). La següent opció més contestada ha estat veure ètic l'avortament terapèutic mentre que la negació de l'ètica de l'avortament, ha estat l'opció menys votada (286 vs 73 vs 29). La resta d'enquestats van respondre potser/ no ho sé/ prefereixo no contestar (36). En aquest cas, també hi ha una petita diferència entre aquells que tenien un conegut afectat ja que, aproximadament, un 3% dels que coneixien va contestar no, mentre que els que no coneixien, el percentatge va augmentar a 8%.

A la darrera pregunta de la segona part de l'enquesta, s'ha notat un ascens significatiu de la quantitat de gent que ha respost "pot ser" (abans voltava els 30-50 respostes i en aquesta pregunta, han estat 136 persones les que han escollit això) perquè segurament, aquesta pregunta no se l'havien fet abans i, per tant, no tenien una resposta formada. Igualment, l'opció més contestada ha estat SI.

Després de rebre la informació sobre els possibles efectes adversos, els resultats han estat els següents. (En aquest cas, he comparat els resultats amb els de la 2a part).

En la primera pregunta de la darrera part, s'ha notat que hi ha un grup de gent que ha deixat de veure ètic modificar els gens. Els resultats han estat 274 respostes per SÍ, ho continuo veient ètic; 104 per no, ja no ho veig ètic i 49 per abans no ho veia ètic i ara tampoc.

En comparar-ho m'he adonat que, aproximadament, un 22% dels que anteriorment ho veien ètic ara no ho veien ètic. També m'he adonat que hi ha una petita quantitat de gent que ha contestat alguna resposta "incoherent" ja que, per exemple, a la anterior pregunta havien contestat que sí i ara han contestat "abans no, i ara tampoc". Aquestes preguntes representen gairebé un 2%, un valor molt petit que es pot deure al fet que han llegit malament algun enunciat, o bé que han contestat sense entendre el que es demanava.

Per finalitzar, a la darrera pregunta, un 20% de les persones que anteriorment ho veien ètic, en aquest moment, no ho veuen d'aquesta manera.

Generalment, la gent té una opinió bastant oberta a les modificacions genètiques perquè, com hem pogut veure, hi ha bastant gent que sí que veia ètica aquesta acció. D'altra banda, la pregunta de les franges d'edat la vaig posar pensant que hi veuria una gran diferència i no va ser així sinó que els resultats en franges eren equivalents.

CONCLUSIONS

Per poder analitzar millor les conclusions, les dividiré en 3 blocs. En primer lloc, revisaré si els objectius han quedat assolits. Seguidament, validaré les meves hipòtesis inicials i, per últim, faré una valoració general sobre el meu projecte.

Primerament, voldria revisar si he assolit els meus objectius.

En primer lloc, poder fer el disseny de gRNAs i PCR ROI *primers* va confirmar que la tècnica CRISPR podia ser utilitzada com a teràpia gènica. Per fer aquests dissenys havia de conèixer l'estructura i funcionament de l'ADN i la tècnica per poder aplicar-la així que puc dir, que he assolit una part dels objectius d'aquest treball: conèixer, comprendre l'ADN i el seu funcionament i aplicar la tècnica per, en aquest cas, la correcció d'un error genètic.

D'una banda, al PCB, per fer el disseny vaig haver d'utilitzar vocabulari científico-tècnic i el programa *Benchling*, dos dels objectius principals de la part pràctica; també vaig haver de conèixer el material i procediments bàsics d'un laboratori per fer els experiments proposats. La síntesi d'aquests experiments, juntament amb les experiències viscudes al PCB, estan recollides all blog, anteriorment mencionat als objectius.

D'altra banda, per fer tot el disseny, he hagut de tenir en compte la bioètica i la seva opinió envers l'enginyeria genètica per no proposar un model no ètic i per la realització de les preguntes de l'enquesta

Malgrat això, la utilització d'enginyeria genètica obre una gran discussió. D'una banda, perquè el *target* no és 100% segur i, per tant, podria donar-se el DSB en un lloc no desitjat, generant altres mutacions. D'altra banda, aquesta tècnica és viable per a cèl·lules que poden ser extretes, perquè d'altra manera es poden introduir els components a cèl·lules directament. Fent això, evitariem que l'ADN víric s'integrés al genoma cel·lular. El problema és que les cèl·lules tractades en aquest treball, les neurones, no poden ser extretes, i per tant, és necessari l'ús d'un vector que podria integrar-se a l'ADN genòmic i esdevenir mutagènic.

Una vegada analitzats els resultats, procedeixo a validar les meves hipòtesis. La principal, que era, "La tècnica CRISPR/Cas9 pot curar la malaltia de Huntington", considero que ha estat prou afirmada amb el disseny dels gRNAs. Malgrat això, caldria experimentar al laboratori si aquests fan la seva funció i realment, permeten curar aquesta malaltia. Malgrat això, amb l'article de (Yang et al., 2017) queda afirmada la meua hipòtesi.

D'altra banda, les hipòtesis secundàries van ser les següents.

Una d'elles era: Les mutacions de l'ADN es donen espontàniament sense cap causa. En aquest cas, aquesta hipòtesi ha resultat errònia ja que la recerca d'informació m'ha fer adonar que les mutacions es poden donar espontàniament, a causa d'un agent mutagènic, o intencionadament, amb tècniques com la utilitzada en aquest treball.

La següent era: Els errors en l'ADN es poden curar. Aquesta hipòtesi ha quedat aprovada ja que, com hem vist, la cèl·lula repara per ella mateixa els errors que detecta però, si no ho fa i es replica, tècniques com la CRISPR poden alterar la seqüència amb l'error per tal que torni a ser normal o bé, que s'expressi d'una manera no nociva.

L'última hipòtesi era: La potència de les tècniques de modificació genètiques no segueix els principis de la bioètica. Aquesta hipòtesi és una mica més complexa ja que algunes modificacions genètiques estan acceptades, però, alhora, molt restringides, perquè només són ètiques si no hi ha cap altre tractament. Cap altra modificació que no estigui inclosa en aquest requisit, no segueix els principis de la bioètica.

Volia concloure amb una visió general del meu treball.

Personalment, he d'admetre que m'hagués agradat fer moltes més coses dins el marc pràctic, però, per falta de temps, no ho he pogut realitzar. Això ho lligo amb la bona elecció del tema ja que, com que m'apassiona tant, seguiria investigant molt més sobre ell.

D'altra banda, el treball m'ha resultat molt satisfactori i complet ja que he assolit tots els objectius marcats i he pogut fer la part pràctica dins d'un laboratori, on m'he format com estudiant i com a científic, per dur a terme el Treball de Recerca.

Espero, en un futur, poder reprendre aquest treball i finalitzar l'experimentació que, per falta de temps i diners, no he pogut dur a terme.

AGRAÏMENTS

Una vegada he acabat aquest treball, voldria expressar la meua gratitud a tothom qui m'ha ajudat i ha contribuït a l'elaboració d'aquest Treball de Recerca.

Primerament, vull agrair enormement al programa BATX2LAB que m'hagin ofert l'oportunitat de fer la meua estada pràctica al Parc Científic de Barcelona, al laboratori, per donar-me un lloc on fer-ho i a la meua professora Isabel Durán per parlar-me'n i animar-me a presentar la sol·licitud (a part de tot el que m'ha ensenyat a classe).

D'una banda, vull donar les gràcies públicament a la Dra. Erika López (Del grup de recerca: Genòmica Biomèdica) i a la Mari, la tècnica de laboratori, per tota la atenció que vaig rebre d'elles... Em van ajudar i ensenyar tot el que van poder tot i jo no demanar-ho, em van acollir com si fos un company més. L'Erika em va ajudar a utilitzar el Benchling, a entendre el funcionament de la tècnica CRISPR i, sobretot, entre totes dues, em van ensenyar a ser un bon científic (sense jo ser-ho).

D'altra banda, vull agrair l'ajuda de la meua tutora del TR de l'institut, Cristina Antón, per haver-me ajudat a presentar la sol·licitud, descobrir-me la tècnica CRISPR, donar-me suport les setmanes d'espera de la llista d'admesos del programa, ja que estava molt nerviós, i estar sempre disponible a ajudar-me en tot el que ha fet falta.

Tampoc vull oblidar-me de la meua professora de biologia, Cati Molina, per haver-me ensenyat tot el que he necessitat saber per estar al laboratori, durant aquests últims anys. I de la meua professora, Montserrat Caballé, per fer la correcció lingüística d'aquest treball de recerca.

Per últim, però no menys important, vull agrair a la meua família el seu suport durant tot el procés d'elaboració i que m'hagin donat tota la motivació per dur-lo a terme.

RECOMANACIONS I ANNEXOS

FOTOGRAFIA DE LA PORTADA:

Schematic representation of the CRISPR-Cas9 system. The Cas9 enzyme (orange) cuts the DNA (blue) in the location selected by the RNA (red). Image courtesy of Carlos Clarivan/Science Photo Library/NTB Scanpix . Retrieved from: <https://news.berkeley.edu/2018/06/19/doudna-charpentier-team-awarded-u-s-patent-for-crispr-cas9/>

DANYS ENDÒGENS:

Els principals són: la modificació de bases per metilacions, el canvi entre bases nitrogenades per desaminació i el dany oxidatiu en l'ADN

- El primer, es produeix quan un enzim inserta un grup metil al carboni 5 de la citosina. “La metilació participa en la regulació de l'expressió gènica de dues maneres: directament a l'impedir la unió de factors de transcripció, i indirectament, propiciant l'estructura tancada de la cromatina”. (Mesa-Cornejo, Viviana Matilde, Barros-Núñez, Patricio, & Medina-Lozano, 2006)
- El següent dany, el canvi entre bases per desaminació, “es produeix quan s'extrau un grup amina d'una base. Si això succeeix, aquesta pot passar a ser una altra base. Per exemple, la desaminització d'una citosina metilada, la converteix en una timina. Aquest canvi, si no és reparat abans de la replicació, podria formar una nova cadena filla amb una adenina en lloc d'una guanina”.(Monsalve Carmona, 2014)
- El darrer dany, l'oxidatiu, “es pot produir a causa del propi metabolisme cel·lular i és causat per les espècies reactives de l'oxigen (ROS, per les seves sigles en anglès de *reactive oxygen species*) com: l'anió superòxid (O_2^-), el peròxid d'hidrogen (aigua oxigenada: H_2O_2) i el radical hidroxil (OH^-). Aquestes molècules actuen com a forts oxidants que reaccionen amb les bases, provocant trencaments simples o dobles de la cadena d'ADN.”(Monsalve Carmona, 2014)

AGENTS EXTERNS FÍSICS

Els principals són: que danyen l'ADN són: les radiacions ionitzants i les radiacions ultraviolades.

- Les radiacions ionitzants són les conegudes com rajos X i rajos γ . “Els rajos esmentats generen radicals lliures, al citoplasma cel·lular, que poden danyar l'ADN. Un exemple és el radical hidroxil del qual hem parlat abans.
- En canvi, les radiacions ultraviolades (UV), malgrat que la capa d'ozó n'absorbeix la major part, els espectres residuals poden produir una unió covalent entre dos

pirimidines (dimerització) adjacents de l'ADN que incrementa la probabilitat que la DNA polimerasa, a la replicació de l'ADN, insereixi un nucleòtid incorrecte. La dimerització també pot ocórrer entre diferents cadenes d'ADN, que impediria la separació de les dues cadenes bloquejant l'expressió del gen".(Monsalve Carmona, 2014).

AGENTS EXÒGENS QUÍMICS

Per un altre costat, els principals són: agents alquilants, agents desaminants, agents utilitzats pel tractament del càncer, anàlegs de bases i agents que s'intercalen.

- Els primers, "originen bases alquilades que donen lloc a transversions i delecions" (Monsalve Carmona, 2014).
- Els següents, com el seu nom indica, desaminen les bases. Per exemple, "l'àcid nítric (HNO₃) desamina l'adenina a hipoxantina i la citosina a uracil. Aquests canvis, provoquen transversions a l'ADN." (Monsalve Carmona, 2014)
- "En canvi, els agents utilitzats pel tractament del càncer, com per exemple, la camptotecina, l'etòpsid, indueixen la formació de trencaments de cadena senzilla o doble de l'ADN".(Monsalve Carmona, 2014)
- D'altra banda, hi ha unes substàncies anomenades anàlogues de bases que "tenen estructures molt similars a les bases i es poden incorporar al seu lloc. Malgrat això, no s'aparellen com les bases normals i indueixen aparellaments erronis durant la replicació." (Universidad Nacional de Quilmes, 2014)
- Finalment, "els agents intercalants, com el seu nom indica, causen insercions o delecions d'un parell de nucleòtids".(Universidad Nacional de Quilmes, 2014)

MUTACIONS CROMOSÒMIQUES:

Hi ha molts tipus d'aquestes anomalies. Les podem categoritzar en dos tipus: numèriques i estructurals.

- Les anomalies numèriques tenen un cromosoma de més o de menys del que seria el parell normal.
- Les anomalies estructurals són les que una part d'un cromosoma en particular falta, està afegida, s'ha passat a un altre o està invertida.

El tipus d'anomalia cromosòmica més conegut és l'aneuploidia que representa una anomalia en la quantitat de cromosomes, és a dir, que hi ha un de més (trisomia) o de menys (monosomia) encara que existeixen més casos de trisomia que de monosomia. Les

aneuploïdies més comuns en bebès nascuts vius són: trisomia 21 (síndrome de Down), 18, 14 i monosomia X (síndrome de Turner), que només té un cromosoma sexual.

REPARACIÓ DELS ERRORS:

La cèl·lula pot reparar errors a l'ADN mitjançant diferents processos. Com hem comentat abans, els podem dividir en: sistemes de reparació directa, per escissió o postreplicatives.

En primer cas, els sistemes de replicació directa utilitza diferents mecanismes:

- Fotoreactivació: “sistema de reparació directa dels danys produïts per la llum UV. La llum UV produeix dímers de pirimidines fonamentalment dímers de Timines. L'enzim Fotoliasa codificat pel gen phr reconeix en la foscor els dímers de Timina i s'uneix a ells, i quan s'exposa a la llum (mitjançant un fotó) desfà el dímer de Timines.” (Universidad Complutense de Madrid, n.d.)
- Transferasa de grups alquil: “elimina els grups llogo produïts pel EMS o per NG. L'enzim metiltransferasa transfereix el grup metil de l'O-6-metilguanina a una cisteïna (cys) de l'enzim.” (Universidad Complutense de Madrid, n.d.)

El següent cas, en la reparació per escissió, a l'igual que a l'anterior, també s'utilitzen diferents mecanismes:

- Reparació dels danys de la llum UV: “Una Endonucleasa talla l'ADN. Una helicasa d'ADN separa les dues hèlixs i retira 12 nucleòtids. L'ADN polimerasa emplena el buit produït per l'Helicasa i la Lligasa segella els extrems.” (Universidad Complutense de Madrid, n.d.)
- Reparació AP: “reparació dels llocs apurínics o apirimidínics. La duen a terme les Endonucleasas AP de la classe I que tallen per l'extrem 3' i les de la classe II que tallen per l'extrem 5'. Una exonucleasa elimina una petita regió que conté entre 2 i 4 nucleòtids, l'ADN polimerasa I emplena el buit i la Ligasa segella els extrems.” (Universidad Complutense de Madrid, n.d.)
- Reparació mitjançant glucosidases: “aquests enzims detecten les bases danyades i les retiren trencant l'enllaç N-glucosídic amb el sucre. Com a conseqüència s'origina una calmi AP que es repara de la forma indicada anteriorment (reparació AP). La Glucosidasa d'Uracil elimina l'Uracil (U) de l'ADN. La Glucosidasa de Hipoxantina, elimina la Hipoxantina (H) de l'ADN. A més d'aquestes dues glucosidases, hi existeixen altres diferents.” (Universidad Complutense de Madrid, n.d.)
- Sistema GO: “dues glucosidases, producte dels gens mutM i mutY, actuen conjuntament per eliminar les lesions que produeix la 8-oxo-G (GO)” (Universidad Complutense de Madrid, n.d.)

Finalment, si la cèl·lula es replica amb l'error, es pot reparar mitjançant diferents processos:

- La reparació d'aparellaments erronis: "requereix un sistema que pugui realitzar les operacions de reconèixer les bases mal aparellades, de determinar quina de les dues bases és la incorrecta i d'eliminar la base incorrecta i sintetitzar-ne una de nova. Aquesta reparació la realitzen els productes dels gens mutH, mutL, mutS i mutU. A més, per distingir l'hèlix de nova síntesi de l'hèlix motlle i així saber eliminar la base incorrecta, el sistema consisteix utilitzar el fet que l'hèlix de nova síntesi triga un cert temps a metilarse l'Adenina (A) de la seqüència GATC, mentre que l'A de la seqüència GATC de l'hèlix motlle ja està metilada. L'enzim que reconeix la seqüència GATC, metilant la A, és la Metilasa d'Adenina." (Universidad Complutense de Madrid, n.d.)
- Reparació per recombinació: "quan l'ADN polimerasa III troba un dímer de Timina (T) produït per llum UV no sap quin nucleòtid posar, saltant la regió i deixant un buit. Com a conseqüència, aquesta regió queda com a ADN d'hèlix senzilla. A causa que la llum UV produeix molts dímers de Timina, es produeix un bloqueig a la replicació i, per evitar que la cèl·lula mori i pugui replicar-se, es dispara el sistema d'emergència SOS." (Universidad Complutense de Madrid, n.d.)
- Sistema SOS: "L'engegada del sistema SOS comença perquè l'ADN d'hèlix senzilla activa la proteïna RecA que, al seu torn, interacciona amb la proteïna LexA. La proteïna LexA és un repressor dels gens uvrA, uvrB, uvrD, sulA i sulB. Tots aquests gens tenen, en el promotor, una seqüència denominada caixa SOS. La proteïna LexA normalment impedeix la transcripció o expressió dels gens citats anteriorment, però, quan interacciona amb la proteïna RecA, deixa d'impedir l'expressió d'aquests gens, podent-se sintetitzar les proteïnes corresponents i reparar els danys produïts per la llum UV". (Universidad Complutense de Madrid, n.d.)

PROTOCOL

Exemple de protocol de Nature: (Ran et al., 2013)

ALTRES TÈCNiques DE MODIFICACIÓ GENÈTICA

- ZNFs: "Les proteïnes de dit de zinc (ZNFs) van ser les primeres de les nucleases de "edició de genomes" per copejar l'escena. Els dits de zinc són el domini d'unió d'ADN més comú que es troba als eucariotes. Normalment estan formats per ~30 mòduls d'aminoàcids que interactuen amb triplet nucleòtids. S'han dissenyat ZNFs que reconeixen totes les 64 possibles combinacions de trinucleòtids i, per

encadenar diferents restes de dit de zinc, es poden crear ZNFs que reconeixen específicament qualsevol seqüència específica de triplets d'ADN. Cada ZNF normalment reconeix de 3-6 triplets de nucleòtids. Atès que les nucleases a les quals s'adjunten només funcionen com dímers, es requereixen parells de ZNF per orientar-se a qualsevol lloc específic: un que reconeix la seqüència cap amunt i l'altre que reconeix la seqüència cap avall del lloc que cal modificar." (Yeadon, n.d.)

- TALENs: Els TALEN - Les nucleases efectores de transcripció són similars a ZNF, ja que utilitzen motius d'unió a l'ADN per dirigir la mateixa nucleasa no específica per escindir el genoma en un lloc específic, però en lloc de reconèixer els triplets d'ADN, cada domini reconeix un únic nucleòtid . Les interaccions entre els dominis d'enllaç ADN derivats de TALEN i els seus nucleòtids objectiu són menys complexos que els entre els ZNF i els seus trinucleòtids objectiu, i el disseny de TALEN generalment és més senzill que ZNF. (Yeadon, n.d.)
- AAV: L'enginyeria del genoma basada en el virus adenoassociat recombinant (rAAV) és una plataforma d'edició del genoma centrada en l'ús de vectors rAAV que permeten la inserció, eliminació o substitució de seqüències d'ADN en els genomes de cèl·lules de mamífers vius. El genoma de rAAV està construït amb àcid desoxirribonucleic de cadena sencera (ss ADN), ja sigui sensible al positiu o negatiu, que és d'aproximadament 4,7 kilobases de llarg. Aquests vectors virals d'ADN monocatenaris tenen altes taxes de transducció i tenen una propietat única d'estimular el gen endògens sense causar trencaments d'ADN de doble cadena en el genoma, que és típic d'altres mètodes d'edició del genoma mediat per endonucleases. (Hirsch & Samulski, 2014)

CONSIDERACIONS BIOÈTIQUES ENVERS LA TÈCNICA CRISPR COM A TERÀPIA GÈNICA:

- La Teràpia Gènica (TG) només hauria de ser aplicada per tractar pacients amb determinades malalties genètiques rares i no com a instrument d'un programa social eugenèsic que tractés de millorar el patrimoni gènic humà. La TG, per tant, no inclou l'estimulació genètica de característiques tals com el comportament, la intel·ligència o l'aspecte físic.
- La TG només s'hauria d'intentar quan no hi ha altres alternatives terapèutiques o quan, havent-hi, suposen un major risc o una menor acció beneficiosa.
- L'aplicació de la TG a una malaltia humana hauria de requerir l'evidència que és segura, beneficiosa, tècnicament possible i èticament acceptable.

- La TG de cèl·lules somàtiques per al tractament de malalties greus pot considerar-se ètica, perquè pot ser recolzada pels principis fonamentals d'autonomia, beneficència i justícia.
- El tractament de cèl·lules somàtiques per mitjà de la TG no presenta problemes ètics diferents als de qualsevol altre tipus de teràpia experimental, tals com la utilització de nous fàrmacs o de tècniques quirúrgiques noves.
- Com s'indicava anteriorment, la intenció de la TG és corregir defectes genètics des d'un punt de vista terapèutic. Per tant, quina seria la valoració ètica de l'ús d'una TG, la fi de la qual no fos terapèutic sinó el d'estimular o perfeccionar fenotips normals? Alguns autors consideren que aquesta enginyeria perfectiva (*enhancement engineering*) podria tenir connotacions eugenèsiques. Aquesta situació podria tenir a veure amb el transhumanisme.
- Una variant de l'enginyeria perfectiva seria intentar alterar o millorar caràcters humans complexos tals com la personalitat, la intel·ligència, etc. que resulten de la interacció de molts gens i de circumstàncies ambientals (enginyeria genètica eugenèsica). Tot i que, per tractar-se de caràcters poligènics, no hi ha possibilitat real d'aplicar una teràpia gènica, no està de més deixar constància de la valoració ètica negativa de l'enginyeria genètica eugenèsica.
- Així com la TG somàtica ha estat àmpliament acceptada per la comunitat científica i positivament valorada des del punt de vista ètic, la teràpia gènica germinal s'enfronta, d'una banda, amb obstacles tècnics i, per una altra, amb disparitat de criteris respecte a la seva valoració ètica. El paper potencial de la manipulació de la línia germinal per a la prevenció de malalties genètiques és molt menys clar que el de la modificació somàtica.

ENTREVISTA: LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON

Una entrevista realizada por Andrés Fernández al Dr. Esteban Muñoz, especialista en la Enfermedad de Huntington,

Entrevistador: Hoy en día, ¿la enfermedad de Huntington podemos definir como una enfermedad neurodegenerativa que no tiene cura?

Dr. Esteban Muñoz: Sí, es cierto

E: Actualmente no tiene cura, pero se está investigando al respecto, ¿verdad?

Dr: Sí, de momento no hay tratamiento curativo.

E: Por lo que he leído, esta enfermedad se empieza a desarrollar a partir de una edad más bien adulta, aproximadamente, ¿a partir de los 30-40 años?

Dr: Esta es la edad media de inicio, pero puede aparecer a cualquier edad, incluso en niños o incluso en personas de edad avanzada de 80 años, hemos visto todo tipo de casos. Pero generalmente la edad media es entre 35-40 años.

E: ¿Es por ese motivo por el que es difícil de detectar esta enfermedad? Porque, ¿aparecen de repente los síntomas?

Dr: Los síntomas aparecen mas bien de manera lenta, como todas las enfermedades degenerativas, es decir, tienen un curso solapado. Pueden aparecer de una manera más larvada donde se van incrementando poco a poco los síntomas hasta que de alguna manera, el paciente o la familia se da cuenta de que lo que pasa no es normal...

E: Además, los síntomas pueden confundirse con otras enfermedades sobre todo si no se conoce ningún antecedente familiar.

Dr: Sí, porque hay manifestaciones muy comunes a las de la población normal como, por ejemplo, la depresión. Muchos pacientes debutan con depresión y como sabemos, en la población normal es prevalente. Por lo tanto, pueden aparecer síntomas "inespecíficos", por decirlo de alguna manera

E: Podrían confundirse con otras enfermedades.

Dr: Claro, sobre todo si no tienes antecedentes familiares pues, igual no sabes identificar o relacionar estos síntomas con una enfermedad en concreto.

E: Supongo que para un doctor de cabecera tiene que ser difícil de diagnosticar

Dr: Es el mismo problema. De hecho, la enfermedad se diagnostica, hoy en día y seguro que va a cambiar porque van a cambiar los criterios, a través de criterios motores porque es más específico de la enfermedad aunque se conoce que muchos de los pacientes en lugar de comenzar con síntomas motores, empiezan con síntomas "psiquiátricos": mayor irritabilidad, se

enfadan más, suelen estar más retraídos, más apáticos, a veces con depresión, en la mayoría de los casos.

E: Cuanto antes se detecte, antes se puede empezar a tratar sintomáticamente

Dr: Sí, claro, se empiezan a tratar los síntomas cuando ya llega un momento en que afectan a la calidad de vida del paciente o de la familia. En un primer momento, se tratan estos síntomas, aunque no se tenga un diagnóstico

E: Es decir, ¿tratar esos síntomas sin pensar que pudiera ser esta enfermedad?

Dr: Efectivamente, por ejemplo, si se da un cuadro depresivo, se trata la depresión más allá de que esté o no ligada a la enfermedad. Evidentemente, lo interesante y de aquí van los estudios es la idea de detectar precozmente la enfermedad antes de que aparezcan los síntomas motores. Porque así de alguna manera, si se pueden detectar una serie de biomarcadores que definan como se desarrolla la enfermedad, en el momento de hacer un ensayo de un tratamiento que tengan un efecto neuroprotector o que retrase la enfermedad, más efecto puede tener en cuanto antes se detecte y se aplique.

E: ¿Podríamos ralentizar un poco la edad de inicio de la enfermedad?

Dr: Eso es.

E: Supongo que esa es la parte difícil, detectar la enfermedad. Ya que, a veces se detecta cuando ya es tarde...

Dr: Lo que pasa es que hay muchos casos, en los que pacientes en riesgo piden hacer un tratamiento presintomático porque quieren saber si en un futuro pueden desarrollar la enfermedad. En estos casos, no son pacientes porque, aunque tengan un defecto genético, no se manifiesta y se empiezan a considerar pacientes cuando los síntomas ya se manifiestan. Muchos de estos, participan hoy en investigaciones para conseguir definir estos biomarcadores para que, aunque no se presente un cuadro clínico, haya algunas características que confirmen la enfermedad como: neuroimagen, marcadores de líquido cefalorraquídeo que mostrarían que la persona está iniciando un proceso neurodegenerativo, ... Y esto es lo que se está investigando ahora: si conseguimos definir bien estos biomarcadores, puedes aplicar un tratamiento y saber si es útil o no. Pero hoy en día, esto es investigación.

E: Son planes de futuro

Dr: Exactamente. Como, por ejemplo, se están investigando tratamientos, que en el caso de una persona tenga síntomas y sean inequívocos de la enfermedad intenten modificar el curso de la enfermedad como, por ejemplo, el tratamiento con oligonucleótidos antisentido, ¿has oído hablar de ellos?

E: No, pero me suena el nombre.

Dr: Ha habido un ensayo clínico en muy pocos centros, en el que se ha visto que es un tratamiento seguro ya que se aplica a nivel intratecal, en el líquido cefalorraquídeo mediante una punción lumbar en la que se inyectan estos oligonucleótidos que evitan la síntesis de la proteína mutada, la huntingtina. Lo que se ha visto es que este tratamiento es seguro y que reduce los niveles de huntingtina mutada en el líquido cefalorraquídeo, lo cual es muy interesante. Ahora se van a empezar estudios de eficacia para ver si es eficaz clínicamente hablando. Seguramente estos tratamientos se empiecen a estudiar a partir del año que viene...

E: Otro punto que me ha parecido curioso, es que la mayoría de los afectados mueren por causas que pueden parecer secundarias como, por ejemplo: infecciones, problemas cardiovasculares, suicidios, ¿podríamos decir que los enfermos se vuelven más vulnerables?

Dr: Esto pasa en todas las enfermedades neurodegenerativas. La gente no muere de estas sino por complicaciones asociadas a la enfermedad. Por ejemplo, si tienen un problema de deglución, broncoaspiran y hacen una neumonía, pueden morir de eso. También, al pasar mucho tiempo en cama, pueden llagarse, pueden tener infecciones e incluso, traumatismos si se caen. Por otro lado, también pueden morir de causas espontáneas atribuidas a problemas cardiovasculares. Pero es lo habitual en las enfermedades neurológicas, se sabe que no están limitadas al sistema nervioso y afectan a otros órganos. Pero lo que, realmente, acaba con la persona suelen ser las complicaciones.

E: ¿Cuál es la afectación aproximadamente de esta enfermedad? ¿Afecta a gran parte de la población?

Dr: No, es una enfermedad rara poco prevalente. Se calcula, en diferentes poblaciones unas 5-10 personas afectadas de cada 100.000 habitantes. Aquí, en Catalunya se está intentando hacer un nuevo estudio de la afectación, pero se necesitan personas y dinero. Calculo que en Cataluña puede haber unas 500-600 personas.

E: ¿Se conoce hoy en día una causa de la mutación o parece ser algo espontáneo?

Dr: Conocer la causa de una enfermedad es muy difícil, pero parece ser que la causa, remonta a Estados Unidos. Parece que el origen fueron dos hermanos marineros que fueron deportados o viajaron y diseminaron la enfermedad. Se sabe que la prevalencia de esta enfermedad es menor en las diferentes poblaciones. En China, Japón, en la población africana, no es tan común por lo que se deduce que es poco probable que haya un efecto fundador, una persona que haya distribuido por todo el mundo, sino que fueron distintas mutaciones que han ido heredándose. Aunque son hipótesis, no hay nada comprobado. Además, este defecto genético está en una región inestable, es decir, que hay un riesgo de que se pueda expandir. Supongo que espontáneamente aparecería y conforme fue pasando generación tras generación como se fue amplificando, dio lugar a la patología de hoy en día, pero esto es solo una hipótesis. Lo que es probable es que no responda a un efecto fundador. Lo que sabemos hoy en día es que no hace falta que haya antecedentes afectados sino, que los progenitores estén en rango premutado y se amplifique.

E: Cambiando un poco de tema, he visto que hay muchos síntomas que pueden indicar esta enfermedad, ¿cuáles son los más comunes o principales?

Dr: Inicialmente el corea, movimiento involuntario, es lo que define la enfermedad, pero también son muy frecuentes los síntomas de tipo psiquiátrico: apatía, cambios de carácter, cambios de humor, ... La parte cognitiva no suele ser el debut más frecuente en la mayoría de pacientes

E: Una vez se hace un primer diagnóstico de que un paciente padezca esta enfermedad, ¿se debe hacer una prueba de ADN?

Dr: El estudio genético solo te confirma la enfermedad, o incluso diagnostica otras más raras que la que pensabas. Entonces este estudio te confirma que tienes esta en concreto. Si tienes antecedentes familiares que siguen un patrón claro e incluso dominante (las personas están afectas), se diagnostica esta enfermedad con un 95% de seguridad. Este 5% corresponde a otras enfermedades o que no se llega a diagnosticar.

E: Siguiendo con el estudio genético, sabiendo que hay personas que saben que tienen familiares afectados, ¿existe gente que prefiere no saberlo? Es decir, no hacerse la prueba para no vivir toda la vida sabiendo que algún día, la enfermedad empezará a manifestarse.

Dr: Aquí hay dos cosas que son un poquito diferentes: una es que tu sepas que hay gente en la familia afectada y, por tanto, tu puedas tener un riesgo y otra cosa es que tu quieras saber si puedes desarrollar esta enfermedad. Son dos cosas un poco diferentes. Una enfermedad no se puede ocultar y cuando una persona joven ve que un familiar está afecto, ya sabe que está afecto. Incluso muchos niños preguntan sobre el estado de sus padres o abuelos. Otra cosa es si en el día de mañana quisieras saber si eres portador o no de la enfermedad. Si este es el caso, se entra en lo que se llama el "Consejo Genético". Este no consiste en que un especialista venga y diga que debe hacerse la prueba sino, que informa de todas las ventajas e inconvenientes de saber si eres portador de la mutación que produce esta enfermedad. Entonces el consejero, que debe tener conocimientos de la enfermedad, debe presentar de manera objetiva e intentando no influir en la decisión de la persona de las ventajas e inconvenientes de saber esto. Es un proceso en el que pretendes ayudar a la persona y no hacerle daño por eso, antes de hacer un estudio genético tienes que asegurarte de que la persona está capacitada para aceptar un diagnóstico que puede ser negativo para ella. Por este motivo, muchas veces, antes del estudio genético hacemos un estudio psicológico/ evaluación psiquiátrica. En este momento, si todo es correcto y la persona quiere hacer este estudio y ha sopesado todas las ventajas y desventajas, se empieza el procedimiento. Así es como se deberían de hacer las cosas. No quiere decir que se hagan como yo digo porque una cosa es como se trabaja en un hospital con áreas especializadas y otra en otros centros en los que no se preocupan de hacer el consejo genético y tramitan directamente las pruebas genéticas. Luego es posible que nos encontremos nosotros con problemas inherentes a esos ya que no se ha informado bien a la persona.

E: Claro, depende de cómo se informe a la persona, puede variar en las decisiones de vida de la persona. Por ese motivo, personalmente veo muy importante este consejo genético.

Dr: Este consejo, se encarga de informar de qué es la enfermedad, que opciones terapéuticas tiene y sus consecuencias, por ejemplo, que el saber que eres portador de esta enfermedad, puede llevar a una disrupción de pareja.

E: ¿Por los síntomas psiquiátricos?

Dr: Bueno, por la posibilidad de que puedas desarrollar la enfermedad, el tema de los hijos, ... Por eso, es muy importante ponerlo todo sobre la mesa incluso los riesgos para asumir una decisión informada.

E: Porque el día a día de una persona, dependiendo de las manifestaciones que tenga, puede ser muy duro.

Dr: Claro, depende un poco de la evolución de la enfermedad. NO es lo mismo una persona con 2 años de evolución que con 15, las manifestaciones incluso a nivel cognitivo pueden ser muy distintas.

E: ¿Puede llegar hasta el punto que esa persona pueda depender de alguien?

Dr: Quizás lo que determina más la dependencia es más el deterioro cognitivo, la pérdida de funcionalidad, el no poder trabajar, realizar las actividades de la vida cotidiana, no poder manejar finanzas...

E: Esta dependencia entonces, puede generar esta disrupción...

Dr: En efecto, aunque también la pareja puede ser un gran punto de apoyo y de ayuda.

E: Ahora, me gustaría que me expresara un poco su opinión sobre la terapia genética, ¿puede aplicarse en esta enfermedad?

Dr: De hecho, ya lo hablamos al principio, ya existe un alcance, aunque solo sea experimental, de terapia genética. No sabemos los resultados, pero si ese estudio resulta eficaz, podría variar la perspectiva de esta enfermedad: de no tener nada a tener una manera de ralentizar o variar el curso de la enfermedad, aunque no cure la enfermedad es algo significativo.

E: Cambiando de tema, la bioética es una parte muy complicada en esta enfermedad y en su tratamiento. Esta influye en decisiones como el aborto, la selección de embriones, ...

Dr: Sí, personalmente, pienso que el aborto es decisión exclusiva de la madre y como he dicho, en el consejo genético no se debe influir en estas decisiones. Por otro lado, la selección de embriones se hace hoy en día para esta enfermedad y para otras enfermedades graves que pueden aparecer en la niñez y que pueden tener consecuencias graves para la vida de estos. Sobre todo, si el pronóstico es la muerte del hijo, a veces, en circunstancias nada agradables. En estos casos, se les ofrece la posibilidad de escoger como serán sus hijos, pero

no escogerlos para hacer un hijo a la carta (que sea rubio, alto, más listo, ...) sino para evitar una mala vida a la descendencia y tener hijos sanos para que el día de mañana no sufran o transmitan esta enfermedad.

El concepto principal es que tu durante el consejo genético no puedes influir en la decisión de esa persona. Aunque yo piense distintos a ellos, yo debo respetar su opinión, sus creencias, su forma de pensar.

REFERÈNCIES, WEBGRAFIA I BIBLIOGRAFIA

- _Zhang Lab's. (n.d.). CRISPR Frequently Asked Questions. Retrieved October 24, 2018, from <https://www.addgene.org/crispr/zhang/faq/>
- ACHE, (Asociación Corea de Huntington Española). (n.d.). ¿Qué es la Enfermedad de Huntington? Retrieved October 20, 2018, from <https://www.e-huntington.es/¿que-es-la-enfermedad-de-huntington/>
- ACMAH, (Associació Catalana de la Malaltia de Huntington). (2009). ACMAH. Retrieved October 20, 2018, from <http://acmah.org/>
- Alemañ, M. (2015). La historia del descubrimiento del ADN. Retrieved from <https://cefegen.es/blogs/la-historia-del-descubrimiento-del-adn-resumen>
- AMB.Inc. (n.d.). 4 ways SaCas9 outperforms spCas9. Retrieved from https://www.abmgood.com/marketing/knowledge_base/img/CRISPR_Cas9/CRISPR-saCas9-vs-spCas9-infographic.pdf?pk_campaign=saCas9-infographic&pk_kwd=kb
- Bioetica web. (n.d.). Edición genómica: ciencia y ética. Retrieved October 14, 2018, from <https://www.bioeticaweb.com/edicion-genomica-ciencia-y-etica/>
- CSIC (Consejo Superior de Investigaciones Científicas). (n.d.). Bioética. Retrieved October 14, 2018, from <http://www.csic.es/bioetica>
- DNA Worldwide. (n.d.). The History of DNA Timeline. Retrieved September 7, 2018, from <https://www.dna-worldwide.com/resource/160/history-dna-timeline#2>
- Doudna, J. (2015). *How CRISPR lets us edit our DNA | TED Talk*. Londres. Retrieved from https://www.ted.com/talks/jennifer_doudna_we_can_now_edit_our_dna_but_let_s_do_it_wisely/
- Gálvez Sánchez, F. J. (2009). *Máster en ingeniería biomédica: Química aplicada a la ingeniería. Ácidos Nucleicos*. Retrieved from https://www.uv.es/tunon/pdf_doc/Acidos Nucleicos_09.pdf
- García, M. D. (n.d.). *Inmunofluorescencia*. Retrieved from <http://www.iib.unsam.edu.ar/archivos/docencia/licenciatura/biotecnologia/2017/BioCel/1504124326.pdf>
- Geneious. (2016). CRISPR site finder. Retrieved October 24, 2018, from <https://assets.geneious.com/manual/9.1/GeneiousManualse72.html>
- Genetics Home Reference - NIH. (n.d.). What is gene therapy? Retrieved October 23, 2018, from <https://ghr.nlm.nih.gov/primer/therapy/genetherapy>
- Guschin, D. Y., Waite, A. J., Katibah, G. E., Miller, J. C., Holmes, M. C., & Rebar, E. J. (2010). A Rapid and General Assay for Monitoring Endogenous Gene Modification (pp. 247–256). https://doi.org/10.1007/978-1-60761-753-2_15

- Hirsch, M. L., & Samulski, R. J. (2014). AAV-mediated gene editing via double-strand break repair. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1114, 291–307. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-761-7_19
- Kahn, J. (2016). *Gene editing can now change an entire species -- forever | TED Talk*. Vancouver. Retrieved from https://www.ted.com/talks/jennifer_kahn_gene_editing_can_now_change_an_entire_species_forever/
- Khan Academy. (n.d.). DNA sequencing (article) | Biotechnology. Retrieved October 24, 2018, from <https://www.khanacademy.org/science/high-school-biology/hs-molecular-genetics/hs-biotechnology/a/dna-sequencing>
- Liu, X., Wang, C.-E., Hong, Y., Zhao, T., Wang, G., Gaertig, M. A., ... Li, X.-J. (2016). N-terminal Huntingtin Knock-In Mice: Implications of Removing the N-terminal Region of Huntingtin for Therapy. *PLOS Genetics*, 12(5), e1006083. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006083>
- López del Val, L. J., & Burguera Hernández, J. A. (2010). *Enfermedad de Huntington : claves y respuestas para un desafío singular*. Buenos Aires : Editorial Médica Panamericana. Retrieved from http://catalog.ub.edu/record=b1975193~S1*spi
- Mena-Enriquez, M., Flores-Contreras, L., & Armendáriz-Borunda, J. (2012). *Adeno-associated viral vectors: methods for production and purification for gene therapy applications*. *Revista de Investigación Clínica* (Vol. 64). Retrieved from <http://www.medigraphic.com/pdfs/revinvcli/nn-2012/nn125i.pdf>
- Mesa-Cornejo, Viviana Matilde, Barros-Núñez, Patricio, & Medina-Lozano, C. (2006). *Metilación del ADN: marcador diagnóstico y pronóstico de cáncer*. *Gaceta médica de México* (Vol. 142). Mexico: Academia Nacional de Medicina. Retrieved from http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0016-38132006000100015
- Molina, C. (n.d.). *Unitat 9: Les lleis de Mendel (dossier del curs de biologia)*.
- Monsalve Carmona, D. M. (2014). *Implicación de las quinasas humanas VRK1 y VRK2 en las rutas de respuesta a daño génico y apoptosis*. Universidad de Salamanca. Retrieved from <http://hdl.handle.net/10261/135954>
- National Institute of Neurological Disorders and Stroke. (n.d.). Huntington's Disease Information Page. Retrieved October 20, 2018, from <https://www.ninds.nih.gov/Disorders/All-Disorders/Huntingtons-Disease-Information-Page>
- Padilla Peña, C. A., Diez Dapena, J., Martínez Galisteo, E., Bárcena Ruiz, J. A., & García Alfonso, C. (n.d.). *17.-Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa. Aislamiento y caracterización electroforética de DNA plasmídico*. Retrieved from <https://www.uco.es/dptos/bioquimica-biol-mol/pdfs/17 ELECTROFORESIS ACS NUCLEICOS GELES AGAROSA.pdf>

- Raisman, J. S., & Gonzalez, A. M. (n.d.). Síntesis protéica. Retrieved October 26, 2018, from <http://www.biologia.edu.ar/adn/adntema2.htm>
- Ran, F. A., Hsu, P. D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D. A., & Zhang, F. (2013). Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature Protocols*, 8(11), 2281–2308. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.143>
- Rodríguez Yunta, E. (2013). Temas éticos en investigación internacional con alimentos transgénicos. *Acta Bioethica*, 19(2), 209–218. <https://doi.org/10.4067/S1726-569X2013000200005>
- Semaka, A., Creighton, S., Warby, S., & Hayden, M. (2006). Predictive testing for Huntington disease: interpretation and significance of intermediate alleles. *Clinical Genetics*, 70(4), 283–294. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2006.00668.x>
- Synthego. (n.d.). *CRISPR 101*.
- UGR (Universitat de Granada). (n.d.). PCR. Retrieved October 25, 2018, from <https://www.ugr.es/~mgarrido/PCR.htm>
- Universidad Complutense de Madrid. (n.d.). La Mutación. Retrieved from [https://www.ucm.es/data/cont/media/www/pag-56185/11-La mutación.pdf](https://www.ucm.es/data/cont/media/www/pag-56185/11-La%20mutaci3n.pdf)
- Universidad Nacional de Quilmes. (2014). *Errores de replicación y daños en el DNA Mecanismos de reparación*. Retrieved from [http://ibcm.blog.unq.edu.ar/wp-content/uploads/sites/33/2014/05/2014_Reparación-del-DNA.pdf](http://ibcm.blog.unq.edu.ar/wp-content/uploads/sites/33/2014/05/2014_Reparaci3n-del-DNA.pdf)
- Wang, G., Liu, X., Gaertig, M. A., Li, S., & Li, X.-J. (2016). Ablation of huntingtin in adult neurons is nondeleterious but its depletion in young mice causes acute pancreatitis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(12), 3359–3364. <https://doi.org/10.1073/pnas.1524575113>
- Yang, S., Chang, R., Yang, H., Zhao, T., Hong, Y., Kong, H. E., ... Li, X.-J. (2017). CRISPR/Cas9-mediated gene editing ameliorates neurotoxicity in mouse model of Huntington's disease. *The Journal of Clinical Investigation*, 127(7), 2719–2724. <https://doi.org/10.1172/JCI92087>
- Yeadon, J. (n.d.). Pros and cons of ZNFs, TALENs, and CRISPR/Cas. Retrieved January 27, 2019, from <https://www.jax.org/news-and-insights/jax-blog/2014/march/pros-and-cons-of-znfs-talens-and-crispr-cas>

