



Facultad de Veterinaria  
Universidad Zaragoza



# Trabajo Fin de Grado en Veterinaria

CRISPR y transgénesis en animales domésticos

CRISPR and transgenesis in domestic animal species

Autor/es

LAURA EGUIARA SALAZAR

Director/es

Pedro Muniesa Lorda  
María Climent Aroz

Facultad de Veterinaria

2019

---

## Índice

1	RESUMEN.....	2
1.1	ABSTRACT.....	3
2	INTRODUCCIÓN .....	4
2.1	Los animales domésticos como modelos biomédicos .....	4
2.2	Los métodos de edición genética y su aplicación en especies domésticas.....	5
3	JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	5
4	METODOLOGÍA.....	7
5	RESULTADOS.....	7
5.1	Edición genómica del cerdo .....	7
5.2	Xenotrasplantes como solución a la carencia mundial de órganos y tejidos humanos .....	9
5.2.1.	Rechazo inmunitario de los xenoinjertos porcinos.....	10
5.2.2.	Mecanismos de actuación sobre el receptor del órgano.....	11
5.2.3.	Inconvenientes de las terapias inmunosupresoras.....	12
5.2.4.	Mecanismos de actuación sobre el animal donante .....	13
5.2.5.	“Rechazo hiperagudo” o “HAR” .....	15
5.2.6.	Generación de “cerdos knockout” .....	15
5.2.7.	“Humanización” de los xenoinjertos.....	16
5.2.8.	“Rechazo vascular agudo” o “AVR” .....	17
5.2.9.	“Rechazo retrasado del xenoinjerto” o “DXR” .....	18
5.3	Uso de CRISPR-Cas9 para evitar el rechazo de los xenoinjertos .....	19
5.4	“Cerdos multitransgénicos” .....	21
5.5	RETROVIRUS ENDÓGENOS PORCINOS o PERVs .....	22
5.5.1.	Transmisión de PERVs en los xenotrasplantes.....	23
5.5.2.	Uso de CRISPR-Cas9 para inactivar los genes implicados en los PERVs .....	25
5.5.3.	Creación de cerdos futuros donadores de órganos desprovistos de PERVs .....	25
5.5.4.	Inconvenientes de la modificación del genoma para inactivar los PERVs .....	26
5.6	FORMACIÓN DE “QUIMERAS ANIMALES” Y OBTENCIÓN DE ÓRGANOS PARA TRASPLANTES.....	26
5.6.1.	“Complementación blastocitaria” entre especies .....	28
5.6.2.	Potencial creación de futuras “Quimeras” entre el cerdo y el ser humano.....	29
6	CONCLUSIONES.....	30
7	CONCLUSIONS.....	31
8	VALORACIÓN PERSONAL .....	32
9	Bibliografía.....	32

## 1 RESUMEN

Las nuevas herramientas de ingeniería genética, como el sistema CRISPR, posibilitan modificar el material genético de cualquier especie animal. La modificación del genoma ha permitido el desarrollo de investigaciones científicas, que con la ayuda de los animales, han derivado en el descubrimiento de importantes avances en la terapia clínica humana.

El uso de los animales domésticos como modelos biomédicos ha permitido el estudio de gran cantidad de enfermedades típicas de los seres humanos, y el desarrollo de posibles terapias ante estas enfermedades. Además, ha permitido la mejora de caracteres de interés en la producción animal, que directamente benefician al ser humano.

Uno de los avances más recientes está siendo la modificación del genoma de los animales domésticos que permitan aportar beneficios en el ámbito de los xenotrasplantes. Mediante la modificación del genoma se intenta solucionar alguno de los problemas derivados del uso de animales como donadores de xenoinjertos. Los principales son: el rechazo inmunológico, y la transmisión de retrovirus endógenos porcinos. Eliminados estos 2 obstáculos se podrían realizar de manera exitosa xenotrasplantes entre el ser humano y otras especies animales, como por ejemplo, el cerdo doméstico.

La formación de “quimeras animales” sería una solución alternativa a la carencia mundial de órganos, actualmente para trasplantar a los seres humanos. Este procedimiento, permitiría el desarrollo de cualquier tipo de células, tejidos y órganos humanos, de manera funcional, en el organismo vivo adulto de otra especie animal, como el cerdo doméstico.

## 1.1 ABSTRACT

New emerging genetic engineering tools, as the CRISPR system, enable the genome edition of any animal species. Genome edition, has permitted the development of many scientific research, that, with the contribution of animals, have evolved into the achievement of important advances in human clinical therapy.

The use of domestic animals, as models for biomedical research, have allowed the study of a great variety of diseases common in humans, and the development of alternative therapies for those diseases. Furthermore, has permitted the improvement in profitable traits concerning livestock production, which directly benefit human beings.

One of the most recent advances is the edition of domestic animal genomes, that enables to provide benefits in the field of xenotransplantation. Through the modification of their genome, disadvantages derived from the use of animals as xenograft donors can be avoided. The main challenges are: immune rejection and transmission of porcine endogenous retroviruses. By avoiding these main hurdles, xenotransplantation between human beings and other animal species, such as domestic pigs, could be achieved successfully.

“Interspecies chimera” formation, could be a promising solution to the shortage of human organs for transplantation at a global scale nowadays. This approach would permit the development of any human cell type, tissue and organ, in a functional manner, within the living adult body of any other animal species, such as the domestic pig.

## 2 INTRODUCCIÓN

### 2.1 Los animales domésticos como modelos biomédicos.

El uso de los animales como modelos biomédicos para llevar a cabo investigaciones científicas, ha supuesto a lo largo de la historia una gran aportación en multitud de áreas de investigación, desde su uso como modelo para estudiar enfermedades humanas, su utilización como reflejo del efecto de terapias médicas y fármacos frente a patologías, su aportación en el campo de la genómica, o como fuente de células, tejidos y órganos en el ámbito de los xenotrasplantes.

Inicialmente el uso de roedores como modelos animales para realizar estas investigaciones, supuso un gran beneficio en el ámbito de la investigación científica. La facilidad y las altas tasas de cría, hicieron posible su uso como modelo biomédico que reflejara de la manera más fiel posible la fisiología humana. Sin embargo, debido a la mayor distancia evolutiva entre los roedores y el ser humano, en comparación con otras especies animales, hizo que se empezaran a emplear a primates no humanos como un modelo animal más preciso respecto al ser humano. El alto coste de mantenimiento, la dificultad de cría, y los impedimentos derivados de las motivaciones éticas por parte de la población, han hecho que se busquen otras alternativas para llevar a cabo las investigaciones científicas basadas en el uso de los animales.

El uso de animales de ganadería, no sólo ha supuesto una gran aportación en el campo de la producción ganadera, sino que también ha aportado beneficios en el área de la medicina y de la terapia clínica humana. Un ejemplo sería la primera oveja clonada conocida como “Dolly”.

Entre los animales de ganadería, hay uno que resulta ser el mejor candidato para su uso como modelo biomédico en las investigaciones científicas, el cerdo doméstico. El cerdo doméstico, por sus similitudes anatómicas, el tamaño de órganos similar al de los seres humanos, además de la existencia de diferentes razas porcinas que podrían asemejarse a los diferentes tamaños corporales de los seres humanos, sus similitudes moleculares y fisiológicas, de esperanza de vida, además de su facilidad de cría y bajo coste, y la capacidad de producir varias camadas con muchos lechones a lo largo del año. Todas estas características hacen al cerdo el mejor candidato hasta el momento.

## 2.2 Los métodos de edición genética y su aplicación en especies domésticas.

La existencia herramientas de ingeniería genética que permiten modificar el genoma de los animales de una manera rápida y eficiente, ha permitido llevar a cabo avances en el ámbito agrario y biomédico.

Estas herramientas de ingeniería genética han permitido alterar el genoma de los animales para estudiar el funcionamiento de dichos genes alterados y proteínas sintetizadas por los genes, y la replicación en los animales de enfermedades típicas de los seres humanos. También es posible la expresión de genes naturalmente no presentes en el genoma de algunos animales, o la eliminación de ciertos genes por sus efectos indeseados en el propio individuo o en otras especies animales, como el ser humano.

El descubrimiento de las endonucleasas, unas enzimas que permiten realizar escisiones en el ADN, ha permitido el uso de los nuevos sistemas de ingeniería genética. Las endonucleasas programables pueden diseñarse para producir cortes en el interior de la doble cadena del ADN, en los lugares específicos deseados, de manera simultánea (Lee et al. 2018).

Actualmente existen 3 tipos principales de endonucleasas programables:

- “ZFN” o “Zinc Finger Nucleases”
- “TALENs” o “Transcriptor activator-like effector nucleases”
- “CRISPR-Cas9” o “Clustered regularly interspaced short palindromic repeats – Cas9”

## 3 JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

La constante y creciente demanda mundial de tejidos y órganos para ser trasplantados a los seres humanos ha hecho que se enfoquen numerosas investigaciones científicas para tratar de solucionar este problema.

Pese al aumento general tanto en número de donantes de órganos como en el número de trasplantes realizados, tanto a nivel mundial, europeo y nacional, el número de pacientes en lista de espera sigue aumentando conforme pasan los años. Esta escasez creciente, pasando de 10,443 pacientes en lista de espera en el año 2018 en Europa a 14,129 pacientes en lista de espera en 2019, ha hecho que se produzca una situación en la que de media mueren 18 pacientes cada día, mientras esperan en lista de espera para recibir un trasplante.

(<https://www.eurotransplant.org/cms/>).

Esta situación ha conducido a que se planteen otras alternativas posibles, como el uso de los xenotrasplantes. En este contexto, se ha considerado al cerdo doméstico como la alternativa más plausible como fuente donadora de xenoinjertos para los seres humanos.

Sin embargo y a pesar de las similitudes, debido a la distancia evolutiva existente entre la especie porcina y la especie humana, la realización de xenotrasplantes entre el cerdo doméstico y el ser humano, presenta algunos impedimentos que sería necesario superar.

Existen principalmente estos 3 obstáculos:

- Rechazo inmunitario de los xenoinjertos porcinos
- Transmisión de retrovirus endógenos porcinos (PERVs)
- Incompatibilidades moleculares y fisiológicas

Con el uso de herramientas de ingeniería genética se podrían eliminar estos 3 obstáculos. Además, se están llevando a cabo investigaciones científicas relacionadas con la formación de “quimeras animales”, que harían posible el crecimiento y desarrollo de tejidos y órganos humanos en organismos vivos de otras especies animales. Estos avances harían factible el empleo de animales, como el cerdo, como donadores de tejidos y órganos humanos, solucionando el problema de escasez de órganos actual.

El objetivo del presente trabajo es realizar una revisión bibliográfica sobre el papel que está desempeñando el uso de las nuevas herramientas de edición genética, en particular las herramientas basadas en CRISPR, en la superación de los problemas fundamentales mencionados.

## 4 METODOLOGÍA

La metodología para realizar este trabajo se ha basado en la realización de una revisión bibliográfica de artículos científicos basados en el uso de tecnologías emergentes de edición genética y su aplicación en la terapia clínica humana. Toda la información adquirida se sintetizó haciendo hincapié en aquella información relevante al ámbito de los xenotrasplantes entre los seres humanos y la especie porcina.

Se han empleado buscadores informáticos de artículos de investigación científica publicados hasta el momento, principalmente en la plataforma PubMed, y en otras plataformas on line de organismos oficiales como la Organización Mundial de la Salud o la Organización Nacional del Trasplante.

Las palabras clave utilizadas en la mayoría de las búsquedas han sido: "CRISPR-Cas9", "CRISPR transgenesis", "xenotransplantation", "rejection xenotransplantation", "PERVs", "chimera formation", "pig biomedical model".

## 5 RESULTADOS Y DISCUSION

### 5.1 Edición genómica del cerdo.

La existencia de las herramientas de ingeniería genética como CRISPR-Cas 9 ha permitido la modificación del genoma porcino de una manera mucho más eficiente, precisa, y rápida, que los métodos de selección genética tradicionales, empleados a lo largo de la historia para producir los fenotipos buscados. Estas herramientas de ingeniería genética permiten conferir rasgos genéticos a los animales que de manera natural no suceden en su especie. Además de la posibilidad de mejorar múltiples caracteres productivos a la vez, las mejoras se producen en 1 sola generación, mientras que con la selección tradicional se requieren varias generaciones para observar estas mejoras. Además, mediante la selección tradicional es muy difícil mejorar algunas características, como la fertilidad o la resistencia a las enfermedades (Whitelaw et al. 2016).

En el ámbito de la producción porcina se han estado llevando a cabo mejoras continuas mediante métodos tradicionales. Sin embargo, este proceso es un proceso lento y poco



eficiente si lo comparamos con el uso de herramientas de ingeniería genética. Con el uso de los nuevos métodos de ingeniería genética, se han podido crear mejoras como (Yang et al. 2018):

- Aumento de la producción cárnica: mediante la generación de cerdos knockout para el gen de la miostatina (MSTN), que genera cerdos con una hipertrofia e hiperplasia muscular y disminución del depósito de grasa (Bi et al. 2016).
- Mayor resistencia viral como el Virus Respiratorio y Reproductivo Porcino (PRRS): mediante la creación de knockout para genes mediadores en la entrada del virus, como el gen CD163, receptores del virus PRRS (Lunney, J.K. 2007).
- Mayor termorregulación: mediante la modificación del genoma se pueden generar cerdos con mayor habilidad para mantener la temperatura corporal cuando son expuestos al frío y una disminución en el depósito de grasa al aumentar la lipólisis.

En el ámbito de la biomedicina los cerdos sirven como el modelo animal óptimo, por sus similitudes con el ser humano, y por su mayor esperanza de vida en comparación con otros modelos animales, que permite estudiar el progreso de las enfermedades. Esto ha permitido el estudio de enfermedades humanas fácilmente replicables en la especie porcina, como las enfermedades hereditarias que dependen de varios genes, o el uso de los cerdos modificados genéticamente como donadores de órganos y tejidos para trasplantar a los seres humanos. En el ámbito de la terapia clínica humana han permitido aportaciones en (Yang et al. 2018)(Rogers, C.S. 2016):

- Enfermedades neurodegenerativas: la creación de cerdos modificados permite simular enfermedades neurodegenerativas de gran prevalencia en los seres humanos como la enfermedad de Huntington, la enfermedad de Parkinson, o la enfermedad de Alzheimer.
- Enfermedades cardiocirculatorias: la modificación del genoma porcino permite el estudio del metabolismo lipídico y de enfermedades como la arteriosclerosis (Huang 2017).
- Diabetes mellitus: debido a las similitudes entre la especie porcina y el ser humano en cuanto a la anatómica del páncreas y al metabolismo de la glucosa y regulación de la

insulina, han permitido estudiar esta enfermedad en los humanos de manera precisa (Perleberg et al. 2018).

- **Cáncer:** mediante la creación de mutaciones en el genoma de los cerdos, la activación de oncogenes, o la inactivación de genes supresores de tumores, se pueden crear tumores específicos de un tejido y observar su comportamiento, y las posibles terapias frente a los tumores (Perleberg et al. 2018).
- **Donadores en xenotrasplantes:** la modificación del genoma porcino ha abierto las puertas a la aportación de células, tejidos y órganos aptos para los xenotrasplantes.

## 5.2 Xenotrasplantes como solución a la carencia mundial de órganos y tejidos humanos.

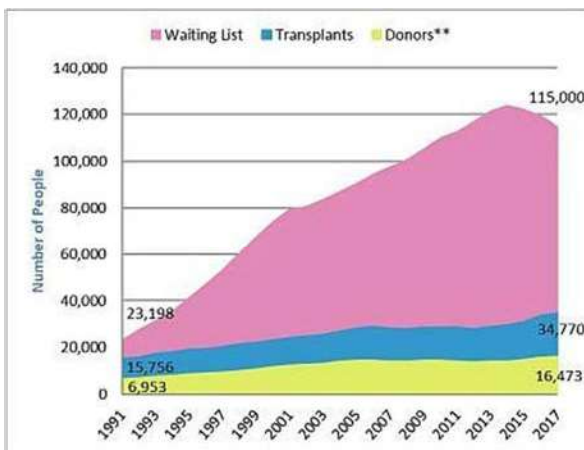
El empleo herramientas de ingeniería genética que permiten modificar el genoma porcino, como el uso de CRISPR-Cas 9 u otros métodos de ingeniería genética, harían posible modificar el genoma de tal manera que se puedan superar impedimentos derivados de la actual escasez de órganos y tejidos. Así se han podido crear “cerdos knockout” y “cerdos multitransgénicos”.

- Ha sido posible producir knockout en el genoma de los cerdos para eliminar la expresión de antígenos de superficie como el epítipo alfa-1,3-Gal, principal causante del rechazo hiperagudo durante la realización de los xenotrasplantes. También se han conseguido eliminar los genes del genoma porcino CMAH y B4GalNT2, responsables de la expresión de antígenos xenoreactivos. O la generación de cerdos knockout para el Factor de Von Willebrand o el Factor de Tejido porcino, implicados en el desencadenamiento de los mecanismos de la coagulación. Mediante la combinación de múltiples knockout en el genoma porcino se han creado “cerdos con triple knockout” que contienen varias modificaciones de manera simultánea.
- También ha sido posible mediante CRISPR-Cas 9 la transgénesis de genes humanos en el genoma porcino. Como la introducción de transgenes que sintetizan proteínas humanas reguladoras del complemento, como las proteínas hCD46, hCD55, y hCD59; transgenes que codifican proteínas humanas inhibidoras de la apoptosis y la inflamación que se producen durante los xenotrasplantes, como la hemooxigenasa

hHO-1 o la proteína hA20; y la expresión de la Trombomodulina humana, que regula el descontrol de la cascada de la coagulación. Se han podido crear “cerdos multitransgénicos” que contienen diferentes transgenes en su genoma.

Mediante la realización de estas modificaciones en el genoma porcino con la ayuda de herramientas de ingeniería genética como CRISPR-Cas9, el cerdo doméstico podría ser la solución futura ante esta carencia creciente a nivel mundial de órganos y tejidos para los trasplantes en los seres humanos.

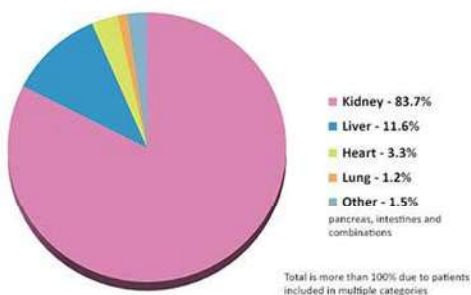
Además es una buena alternativa para aquellos pacientes que han experimentado previamente rechazo a órganos trasplantados de origen humano por una alta sensibilización al antígeno leucocitario humano o HLA, o en aquellos pacientes que tras haber recibido un alotrasplante desarrollaron una patología primaria (Tandukar S and Hariharan S. 2018).



**Imagen:** Representación gráfica que muestra desde 1991 hasta 2017, la relación entre el número de donantes, el número de trasplantes realizados y el número de pacientes en la lista de espera para recibir un trasplante, al final de cada año.

Demuestra cómo desde 1991 hasta la actualidad el número de pacientes en la lista de espera continúa siendo superior al número de donantes. <http://optn.transplant.hrsa.gov/>.

**Organs People Are Waiting For (7/2019)**



**Imagen:** Muestra para el mes de julio de 2019 la relación de cada tipo de órgano necesitado en la lista de espera de pacientes estadounidenses. Reflejado en la lista de espera de trasplantes de la administración de servicios sociales y sanidad de los EEUU (HSRA, Health Services and Resources Administration).

Figura obtenida de <http://optn.transplant.hrsa.gov/>.

### 5.2.1. Rechazo inmunitario de los xenoinjertos porcinos.

El uso de cerdos modificados genéticamente para hacer frente a la necesidad de tener una fuente de células, tejidos y órganos para ser trasplantados a los seres humanos, ha supuesto 2 principales impedimentos: la presencia de retrovirus endógenos en el genoma porcino (PERVs), y el rechazo que se produce frente a los xenoinjertos por parte del receptor (Niemann et al. 2016).

Cuando se realizan xenotrasplantes entre individuos se desencadena una respuesta inmunitaria en el individuo receptor del órgano trasplantado y se produce un rechazo del xenoinjerto. Esto se debe a que durante la adaptación evolutiva las diferentes especies, han desarrollado moléculas y reacciones metabólicas diferentes, que regulan importantes procesos biológicos en el organismo, como la cascada del complemento o los mecanismos de coagulación, además de las diferentes glicoproteínas de superficie. Estas diferencias serán reconocidas como extrañas por el organismo del receptor del xenoinjerto y causarán un rechazo de este (Niemann et al. 2016).

#### **Las 3 principales barreras inmunológicas durante el rechazo**

Las 3 principales barreras inmunológicas existentes cuando se produce un xenotrasplante son (Niemann et al. 2016):

- o Un **rechazo hiperagudo** (HAR, Hyperacute rejection)
- o Un **rechazo vascular agudo** (AVR, Acute vascular rejection)
- o Un **rechazo crónico** en el tiempo (DXR, Delayed xenograft rejection)

Para hacer frente a estas 3 barreras inmunológicas se han planteado 2 vías de actuación, una vía enfocada en el animal donante, en este caso el cerdo, y otra vía enfocada en el hospedador receptor del xenoinjerto.

### 5.2.2. Mecanismos de actuación sobre el receptor del órgano.

Actualmente las vías de actuación enfocadas en el hospedador se centran en el uso de nuevas terapias inmunosupresoras. Como terapias inmunosupresoras exitosas en xenotrasplantes de cerdos a primates no humanos se han empleado (Choi et al. 2018):

- **Corticosteroides** convencionales, como la Ciclosporina, habitualmente utilizada en alotrasplantes de órganos entre los seres humanos en la terapia humana.
- **Bloqueadores de los estimulantes de los linfocitos T** como son los anticuerpos anti- CD4+T, anti-CD 154 y anti-CD40.
- **Anticuerpos que bloquean la actividad de los linfocitos B** como es el anti-CD20.
- **Inmunosupresores** disponibles comercialmente como son Basilimax o Tacrolimus.
- **Agentes que secuestran células de los linfonodos**, como el fármaco Fingolimod.

Las terapias inmunosupresoras han mostrado muy buenos resultados en los primates no humanos que han recibido los xenoinjertos porcinos. No sólo en la inhibición de la respuesta inmunitaria frente a órganos trasplantados, sino que además han tolerado de manera segura los xenoinjertos durante los 6 meses posteriores al xenotrasplante (Choi et al. 2018). Esto da una idea de cómo una buena terapia inmunosupresora puede ser una buena alternativa para evitar el rechazo. Y cómo se puede mantener en el tiempo la normalidad de los órganos trasplantados y la salud del propio paciente.

### 5.2.3. Inconvenientes de las terapias inmunosupresoras.

A la hora de establecer una terapia inmunosupresora, hay que tener en cuenta el mayor riesgo de infección que puede tener lugar al disminuir la respuesta inmunitaria. Una infección que puede ser producida tanto por patógenos derivados del cerdo donante, como por patógenos oportunistas derivados del propio hospedador.

El riesgo de transmisión puede ser mayor si se realizan xenotrasplantes entre cerdos y seres humanos, que entre otras especies animales debido a la mayor similitud entre la especie porcina y la humana. Esta similitud, hace que compartamos gran cantidad de microorganismos patógenos, que podrían dar lugar a zoonosis. Esta particularidad epidemiológica se conoce

como “xenozoonosis”, es decir una infección producida por microorganismos derivados de tejidos no humanos que han sido trasplantados (Fishman et al. 2012).

Para prevenir las “xenozoonosis”, se pueden realizar controles analíticos rutinarios de los cerdos criados para los xenotrasplantes, y análisis previos al xenotrasplante de cada animal. También es clave disminuir la utilización rutinaria de antibióticos para evitar el crecimiento de microorganismos patógenos resistentes a los antibióticos, y aumentar las condiciones de bioseguridad en las granjas de cría de los animales donantes para disminuir la entrada y diseminación de patógenos (Fishman, J. 2018). Esto evitaría tener que depender de una fuerte terapia inmunosupresora al realizar xenotrasplantes, y de esta manera disminuir el riesgo de transmisión de patógenos.

Es de gran importancia conocer cuáles son los microorganismos patógenos que pueden ser transmitidos de los cerdos donantes a los seres humanos receptores de los xenoinjertos. No sólo por la propia salud del receptor del órgano sino por el posible riesgo de transmitir el patógeno a otros seres humanos. Es por ello muy importante el papel de los veterinarios en el conocimiento de las posibles zoonosis al realizar los xenotrasplantes. Basados en la experiencia de los patógenos que se desarrollan con más frecuencia durante los xenotrasplantes entre cerdos y primates no humanos, o entre alotrasplantes de seres humanos inmunodeprimidos, se han creado los cerdos “Designated pathogen free” o cerdos “Designados libres de patógenos” (Fishman J. 2018).

#### 5.2.4. Mecanismos de actuación sobre el animal donante

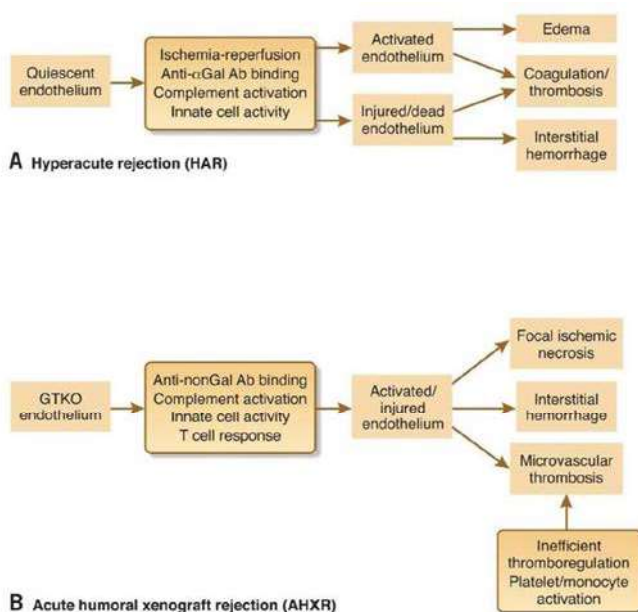
Para evitar la posible transmisión de microorganismos patógenos entre cerdos donantes y seres humanos receptores de órganos, lo ideal sería poder usar la menor terapia inmunosupresora posible. Esto se podría lograr evitando en el animal donante los factores que desencadenan una respuesta inmunitaria en el receptor. Para ello, la modificación del material genético de los cerdos es necesario, lo que se puede conseguir con el uso de CRISPR-Cas9.

Para conseguir esta modificación del genoma porcino donante de órganos que nos permita moldear su material genético de manera que podamos alterar los genes que están implicados en el desencadenamiento de la respuesta inmunitaria en el receptor del órgano trasplantado,

se han empleado herramientas de ingeniería genética, tanto tradicionales como edición del genoma mediante nucleasas y más recientemente CRISPR-Cas 9.

Hasta el momento se han llevado a cabo más de 40 modificaciones en el genoma porcino. Para controlar el rechazo que se produce como consecuencia de este descontrol en la respuesta inmunitaria, es necesario atajar el problema de múltiples maneras. Debido a la complejidad del proceso que se produce durante el rechazo y debido a que están implicadas multitud de moléculas y vías, es necesario actuar sobre cada una de estas vías para tener éxito en la evasión del rechazo. Las 3 principales barreras inmunológicas que se producen durante el rechazo son:

- o Un rechazo hiperagudo o HAR (hyperacute rejection).
- o Un rechazo vascular agudo o AVR (acute vascular rejection).
- o Un rechazo crónico o DXR (delayed xenograft rejection).



**Imagen A:** Varios factores implicados en el desarrollo del rechazo hiperagudo (HAR) en un órgano WT (Wild Type). El factor más importante es la unión de anticuerpos preformados anti-alfaGal a las células del endotelio vascular del xenoinjerto y consecuentemente la activación del sistema del complemento. La HAR se podría prevenir mediante la creación de órganos knockout para el antígeno alfaGal (órganos GTKO) o la expresión de transgenes humanos reguladores del sistema del complemento. Proceso que sucede en cuestión de horas.

**Imagen B:** Rechazo humoral agudo (AHXR) relacionado con el rechazo vascular agudo en xenoinjertos GTKO. En este caso también están involucrados anticuerpos, pero en este caso anticuerpos anti-non-Gal. Es un proceso gradual que se prolonga durante días a semanas. Y en el están involucrados fenómenos proinflamatorios e inductores de la coagulación en el tejido vascularizado.

Imagen extraída de Kidney Xenotransplantation (Cowan et al. 2014).

### 5.2.5. “Rechazo hiperagudo” o “HAR”

El rechazo hiperagudo o HAR, se produce en las primeras horas tras el xenotrasplante. Se ha descubierto que este proceso está causado principalmente por la respuesta de los anticuerpos humanos frente al antígeno de superficie porcino o epítipo galactosyl-alfa-1,3-galactosa o Gal@-1,3-Gal. Este antígeno, es un carbohidrato de superficie, que se encuentra presente en la superficie celular de muchos mamíferos, incluido el cerdo, pero que no se encuentra en primates o humanos, por lo que esta partícula resulta extraña para el sistema inmunitario humano (Zeyland, J. et al. 2013).

Como el epítipo alfa-1,3-Gal se expresa en muchos microorganismos, e incluso en productos derivados de los animales, los seres humanos, hemos desarrollado de manera natural anticuerpos frente a esta glicoproteína, llegando a poseer un 1 % de anticuerpos anti-Gal, del total de los anticuerpos circulantes en nuestra sangre (Galili, U. 2013).

Al haber desarrollado anticuerpos frente al epítipo alfa-1,3-Gal, durante el xenotrasplante, el sistema inmunitario humano reconocerá el antígeno de superficie y desarrollará un rechazo hiperagudo o HAR mediado por los anticuerpos anti-Gal que se encuentran presentes en la circulación sanguínea. Estos anticuerpos anti-Gal se unen al endotelio de los tejidos y órganos porcinos vascularizados, activando la cascada del complemento, y la cascada de la coagulación.

Si el epítipo alfa -1,3-Gal es el principal causante del rechazo hiperagudo, evitando la expresión de este antígeno, se evitaría en gran medida el HAR durante los xenotrasplantes.

Mediante la silenciación del gen codificante para la enzima alfa-1,3-galactosyltransferasa, denominados gen GGTA1, se puede conseguir inhibir la expresión en la superficie de las células del este antígeno.

### 5.2.6. Generación de “cerdos knockout”

Con el uso de CRISPR-Cas9, se pueden crear cerdos knockout para este antígeno. El uso de cerdos knockout para los antígenos responsables del rechazo, harían posible disminuir la terapia inmunosupresora, y por tanto los efectos secundarios que ello conlleva, previamente explicados. Lo ideal sería una combinación de xenoinjertos lo menos inmunógenos posible, y



por otro lado, usar terapias inmunosupresoras lo menos agresivas posible.

Este enfoque ya se ha llevado a cabo con éxito en algunos laboratorios. Para producir cerdos knockout para el gen responsable de la síntesis de la enzima alfa-1,3-galactosylaminotransferasa, que se encuentran en el locus GGTA1 del genoma, primero se llevaron a cabo modificaciones del genoma de los fibroblastos obtenidos de la oreja de un cerdo. Estos fibroblastos fueron modificados genéticamente para eliminar la expresión de la enzima, y posteriormente se llevó a cabo una transferencia nuclear de los. De esta manera se consiguió crear embriones de cerdos knockout para el antígeno alfa-1.3-Gal (Kolber-Simonds et al. 2004). Este logro daría paso al inicio de la modificación del genoma porcino para evitar los rechazos en los xenotrasplantes a humanos.

Inhibiendo la expresión del epítipo alfa-1,3-Gal se consigue principalmente reducir la actividad del sistema inmunitario adaptativo, pero no celular. Lo que implica que inhibiendo únicamente la expresión del antígeno alfa-1,3-Gal no sería suficiente para atajar el problema del rechazo hiperagudo, pues existen otros mecanismos celulares implicados en el desarrollo del rechazo.

Esta generación de cerdos GalTKO o GGTA1KO, permite que se evite el rechazo hiperagudo que se produce en los xenotrasplantes y permite alargar el tiempo de vida de los xenoinjertos en los pacientes receptores. Este fenómeno ha podido comprobarse en xenotrasplantes de corazones de cerdo en babuinos. Los corazones de cerdos Gal-KO que fueron trasplantados heterotópicamente en babuinos, sobrevivieron durante más de 1 año en babuinos (Mohiuddin et al. 2014). Esto demuestra la efectividad de la generación de estos cerdos knockout para alargar la supervivencia de los xenoinjertos.

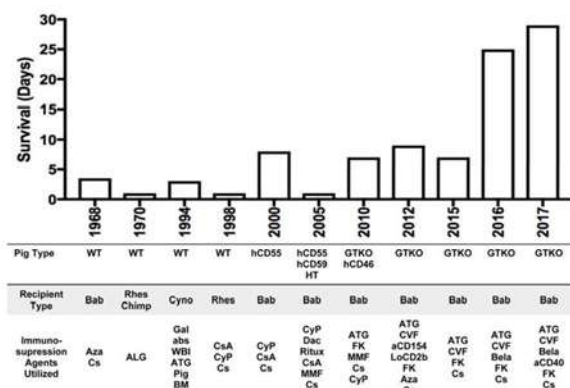
### 5.2.7. “Humanización” de los xenoinjertos.

Otra alternativa ideada es la de crear tejidos y órganos porcinos lo más parecidos posible a los tejidos y órganos humanos. Es decir “humanizarlos”. Una alternativa sería la de transgénesis de genes humanos en el genoma porcino. De esta, manera se podría conseguir expresar moléculas humanas en el organismo porcino. Una solución posible es la creación de cerdos que expresen proteínas humanas clave en la regulación de los procesos involucrados en la respuesta inmunitaria y de rechazo en el receptor de los xenoinjertos.

- Un ejemplo es la proteína humana **CD46** (hCD46), la cual es reguladora del sistema del complemento (Burdorf et al. 2016).
- Otro ejemplo es la creación de cerdos que expresen la **trombomodulina humana**. La trombomodulina es una glicoproteína humana que se encuentra en el endotelio vascular, y que actúa como anticoagulante impidiendo la agregación plaquetaria (Mohiuddin et al. 2014).

Hay que ser precavidos con la “humanización” del genoma porcino, pues la expresión de moléculas y proteínas humanas en las células del cerdo donante, podría favorecer el desarrollo de enfermedades infecciosas humanas, que no son propias de cerdo, y que se desarrollan en el animal gracias a la presencia de estas proteínas que pueden actuar como receptores celulares de ciertos patógenos propios de los seres humanos. Un ejemplo de microorganismo patógeno que se ha comprobado haber sido transmitido al realizar un xenotrasplante es el virus del sarampión humano (Fishman et al. 2004).

**Figura:** Este diagrama de barras muestra el progreso en la supervivencia (medido en días) de



xenotrasplantes de hígado, de cerdos: sin modificación del genoma (WT); cerdos transgénicos para las proteínas humanas reguladoras del complemento hCD55; hCD59; hCD46; el transgen humano H, para la expresión del antígeno de superficie H; y de cerdos knockout para el gen GGTA1. En diferentes especies de primates no humanos. Usando

diferentes combinaciones de terapias inmunosupresoras. La tabla refleja como el uso de cerdos GGTA1-KO junto con una terapia inmunosupresora específica ha conseguido incrementar el número de días de supervivencia del hígado trasplantado en primates. Imagen obtenida de Liver transplantation (Patel et al. 2017).

### 5.2.8. “Rechazo vascular agudo” o “AVR”.

La eliminación del epítipo alfa-1,3-Gal del endotelio de los xenoinjertos y la expresión de proteínas humanas a reguladoras del complemento, no consiguen evitar definitivamente el rechazo, ya que participan otros mecanismos del sistema inmunitario en el desarrollo del rechazo.

A parte del desarrollo del rechazo hiperagudo, existen otros mecanismos inmunitarios que causan una coagulación intravascular diseminada (CID), y una microangiopatía trombótica (MAT) en el organismo receptor del xenoinjerto. Estos mecanismos producen el rechazo vascular agudo o AVR (Acute Vascular Rejection) (Lin et al. 1998). Además, esta activación de los mecanismos de coagulación y la trombosis intravascular, se pueden ver incrementadas por la incompatibilidad molecular existente entre moléculas reguladoras presentes en el endotelio del órgano trasplantado y moléculas dianas humanas presentes en la sangre del receptor. Un ejemplo es la incompatibilidad entre la trombomodulina (TM) porcina y la proteína C humana. La trombomodulina porcina no consigue inhibir los mecanismos de activación de la coagulación en el receptor del órgano trasplantado al no actuar como cofactor para activar la proteína C en humanos (Roussel et al. 2008). Además de los problemas derivados de la inadecuada inhibición de la coagulación, un aumento de la coagulación puede desencadenar una reacción inflamatoria inmediata, lo que agrava el rechazo. Es necesario controlar estas incompatibilidades para crear un adecuado funcionamiento fisiológico del órgano trasplantado.

#### 5.2.9. “Rechazo retrasado del xenoinjerto” o “DXR”.

Además del rechazo hiperagudo y del rechazo vascular agudo, aún se produce un rechazo del xenoinjerto crónico en el tiempo.

- **Los linfocitos T** tienen una función importante en el desarrollo del rechazo crónico de los xenotrasplantes, pues son clave como mediadores de la respuesta inmune celular. Si se suprime la actividad de los linfocitos T en los receptores, la supervivencia de los xenotrasplantes se ve incrementada (Scalea et al. 2012).
- También es de importancia conocer la actuación del sistema inmunitario innato. Las células **Natural Killer, macrófagos, y neutrófilos**, se activan cuando reconocen patrones moleculares que identifican como patógenos, y pueden actuar independientemente al sistema del complemento o a los anticuerpos cuando reconocen moléculas extrañas, en este caso de la especie porcina (Niemann et al. 2016).

### 5.3 Uso de CRISPR-Cas9 para evitar el rechazo de los xenoinjertos.

La existencia de CRISPR-Cas9 hace posible la creación de cerdos multitransgénicos, y por tanto se podría modificar el genoma de los cerdos donantes de forma que aúnen todos los requisitos que hasta ahora se han comprobado más eficaces a la hora de evitar el rechazo de los xenotrasplantes, como:

- La eliminación del **epítipo alfa-1,3-Gal** de la superficie de las células.
- La expresión de la proteína reguladora del sistema del complemento **hCD46**.
- La expresión de la **trombomodulina** humana.

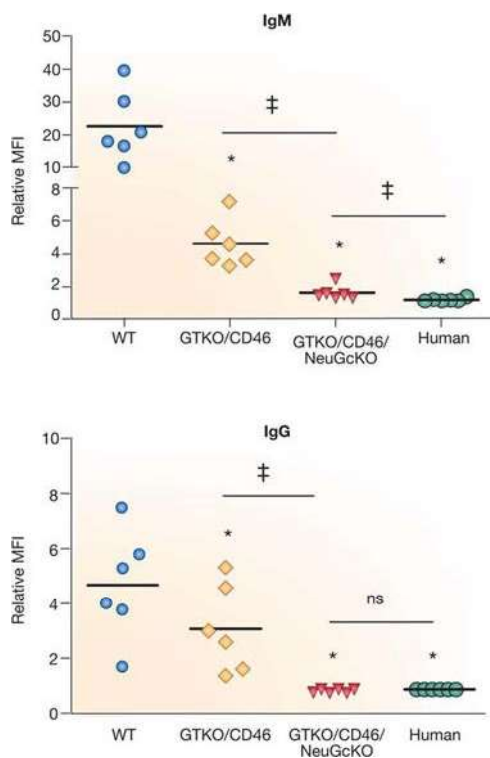
Ya que en el desarrollo de la respuesta inmune están implicadas multitud de moléculas, es previsible que existan moléculas implicadas que aún no han sido descubiertas como promotoras del rechazo a los órganos porcinos. Se están desarrollando investigaciones para descubrir todos los mecanismos implicados. Durante estas investigaciones, tras la eliminación del genoma porcino del antígeno alfa-1,3-Gal, se han ido descubriendo la presencia de otros antígenos involucrados en el desencadenamiento del rechazo, como el ácido N-glicolilneuramínico o Neu5Gc y la enzima B4GalNT2.

- El **Neu5Gc** es la forma glicosilada del ácido neuramínico. Este se encuentra ampliamente presente de manera natural en los tejidos animales y algunas bacterias. Durante el desarrollo evolutivo los seres humanos hemos perdido la forma glicolilada del ácido neuramínico. Debido a que la forma glicolilada se encuentra en productos derivados de los animales, como la leche y la carne, puede expresarse en la superficie celular del epitelio y en los endotelios, y como consecuencia, algunos seres humanos pueden desarrollar anticuerpos frente al Neu5Gc (Padler-Karavani et al. 2011). Otra modificación esperanzadora del genoma porcino podría ser la disrupción de la formación de la forma glicolilada del ácido neuramínico en la superficie celular de los cerdos donadores para evitar el rechazo.
- La enzima **B4GalNT2** ha demostrado ser importante en el desencadenamiento del rechazo frente a tejidos de cerdo. En xenotrasplantes de corazón de cerdos GGTA1-KO a babuinos, algunos de estos seguían desarrollando rechazo al xenotrasplante. Se analizó la sangre de estos babuinos y se detectaron anticuerpos frente al glicanos producido por la enzima B4GalNT2 (Byrne et al. 2018).

Hasta el momento, aquellos genes que se ha comprobado que están involucrados de manera principal en los mecanismos del rechazo hiperagudo y el rechazo vascular agudo de los xenotrasplantes, son:

- El gen **GGTA1**, como responsable de la producción del antígeno alfa-1,3-Gal.
- El gen **CMAH**, como responsable de la síntesis de la forma glicolilada del ácido neuramínico.
- El gen **B4GalNT2**, como responsable de la producción de glicanos xenoreactivos.

Ya que la herramienta CRISPR-Cas9 permite producir modificaciones en el genoma de forma simultánea, mediante la modificación de estos 3 genes simultáneamente en el genoma porcino, se podrían crear cerdos con triple knockout, como por ejemplo un cerdo GGTA1/CMAH-/B4GalNT2-KO.



**Figura:** Inmunoglobulinas humanas IgM e IgG uniéndose a células endoteliales aórticas porcinas y humanas (AECs) (medido por citometría de flujo).

- La unión de anticuerpos IgM (arriba) e IgG (abajo) a las células AECs en cerdos GGTA1KO/CD46 es considerablemente menor que en cerdos WT (Wild type, es decir no modificados genéticamente).
- Es aún mayor la disminución de la unión de las inmunoglobulinas tanto IgM como IgG a las células de cerdos con triple modificación del genoma GGTA1KO/CD46/Neu5GcKO.
- La unión de IgM a estas células es bastante mayor en los cerdos con triple knockout del genoma que en seres humanos.
- Sin embargo esta diferencia de unión entre cerdos con modificación del genoma y seres humanos no es tan acusada con IgG.

Imagen extraída de Renal xenotransplantation: experimental progress and clinical prospects (Wijkstrom et al. 2017).

La generación de cerdos transgénicos para evitar esta incompatibilidad molecular entre moléculas reguladoras de la coagulación porcina y moléculas diana humanas, haría posible controlar los mecanismos de inhibición de la coagulación en el receptor de órganos, y de esta manera controlar el rechazo vascular agudo.

Moléculas humanas hasta ahora conocidas que están implicadas en la cascada de la coagulación y por tanto podrían ser susceptibles de ser expresadas en cerdos transgénicos son la trombomodulina humana (HTM) (Roussel et al. 2008), el factor de tejido porcino (TF) (Ahrens et al. 2015), y el factor de Von Willebrand (vWF) (Burdorf et al. 2016). Si se consiguiese expresar transgenes humanos de estas 3 moléculas en órganos porcinos podría disminuirse potencialmente el rechazo vascular agudo.

Además de la expresión de proteínas humanas reguladoras del sistema del complemento y de la cascada de la coagulación en el genoma porcino, la expresión de ciertos transgenes humanos con actividad anti-apoptótica y antiinflamatoria, podría ser clave si se desea lograr una inhibición completa del rechazo en los xenotrasplantes.

- Un gen candidato para ser modificado debido a su implicación en la apoptosis e inflamación es el gen **hHO-1** o hemooxigenasa humana (Yeom et al. 2012).
- Otra molécula implicada en la regulación de la inflamación y la apoptosis celular es la proteína humana **hA20** (Ahrens et al. 2015).

Estas 2 modificaciones podrían ayudar a evitar el rechazo crónico que se produce durante los xenotrasplantes. La capacidad antiinflamatoria y anti-apoptótica evitan el daño isquémico que se produce durante el rechazo al inducir una vasodilatación e inhibición de la agregación plaquetaria.

#### 5.4 “Cerdos multitransgénicos”

Mediante la aplicación de diferentes transgenes, y la generación de diferentes knockouts, se podría superar la mayoría de los impedimentos que suceden durante el proceso del rechazo, y conseguir aumentar la supervivencia de los xenoinjertos porcinos en seres humanos. Por esta complejidad en el proceso de la respuesta del sistema inmunitario, parecería prometedor la creación de cerdos multitransgénicos, ya que cada gen puede actuar durante las diferentes fases del proceso del desencadenamiento del rechazo.

Un ejemplo de éxito en la producción de cerdos multitransgénicos ha sido la creación de cerdos con una triple modificación en el genoma.

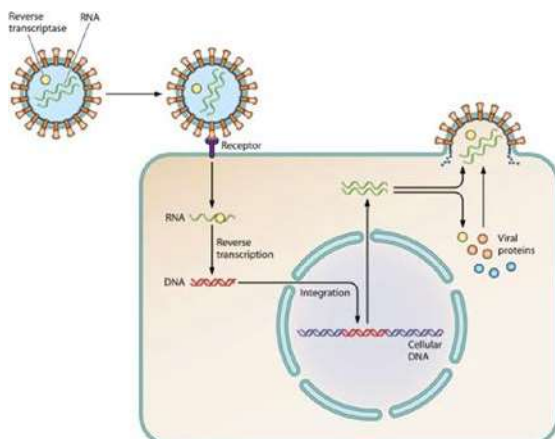
- La generación de cerdos multitransgénicos GGTA1-KO/hHO-1/hA20 ha demostrado tener éxito en la inhibición del rechazo (Ahrens et al. 2015).
- Otra línea de cerdos multitransgénicos beneficiosa en el rechazo de los xenotrasplantes es la línea porcina GGTA1-KO/CD46/hTM (Fischer et al. 2016).

## 5.5 RETROVIRUS ENDÓGENOS PORCINOS o PERVs.

Los PERVs son retrovirus gamma que se encuentran en el genoma de todas las especies de mamíferos, incluidos la especie porcina. Los retrovirus gamma presentes en la especie porcina son capaces de liberar partículas virales e infectar otras células de su misma especie y de otras especies animales (Weiss, R.A. 2013). Mientras que los retrovirus endógenos presentes en el genoma humano (HERV) no tienen capacidad de replicarse y de causar infección (Denner, J., 2016b).

Hasta el momento se conocen 3 subtipos de PERVs, los subtipos PERV-A y PERV-B que se encuentran presentes en la mayoría de las especies de animales, incluidos los seres humanos, y el subtipo PERV-C que no ha demostrado tener tropismo por células humanas, y sólo por células de la especie porcina (Kimsa et al. 2014).

La existencia de PERVs en el genoma porcino y su posible transmisión a los seres humanos durante los xenotrasplantes, hace que se tome el principio de precaución, y se están llevando a cabo investigaciones para tratar de comprobar la transmisión real a los seres humanos. Ya que hasta el momento no se ha podido demostrar que causen una zoonosis en los seres humanos en vivo (Fishman et al. 2012).



**Imagen:** Ciclo de PERVs: 1. Unión de la glicoproteína gp70 de la superficie de la envoltura viral al receptor de membrana celular. 2. Cambios en la conformación de la gp70. 3. Fusión de las membranas del virus y de la célula. 4. Se produce una endocitosis mediada por receptor. 5. Entrada del virus en la célula. 6. El ARN viral entra en el citoplasma como un complejo nucleoprotéico. 7. La transcriptasa inversa produce el ADN viral. 8. El ADN viral se transporta hasta el núcleo celular y se integra en el ADN cromosómico de la célula. (Imagen extraída de Denner, J. et al. 2012).

### 5.5.1. Transmisión de PERVs en los xenotrasplantes

Para poder determinar la infección de los PERVs en células se lleva a cabo un análisis del número de copias de los provirus y el nivel de expresión de los PERVs. Ya que se ha identificado diferente número de copias de PERVs en diferentes líneas celulares, es necesario conocer el número específico de copias de cada línea celular para determinar si aumentan o se mantienen en número. Esto permite seleccionar los cerdos con menor número de copias de PERVs y asegurar de esta manera un xenotrasplante más seguro.

Con el uso de diferentes métodos para determinar la presencia de PERVs se ha podido determinar la presencia de PERVs en células humanas que han sido cultivadas en cultivo celular junto a células porcinas (Yang, L. et al. 2015). Esto demuestra que los PERVs pueden infectar células humanas en un cultivo celular.

Para poder determinar la transmisión de los PERVs entre células humanas, se ha creado una línea celular de células humanas embrionarias de riñón a las que se les ha inoculado con PERVs, y a las que se les ha marcado con la proteína fluorescente verde para poder monitorizarlas. A esta línea celular se le ha denominado i-HEK293T-GFP (Yang, L. et al. 2015).

La GFP, es una proteína con fluorescencia verde, que permite monitorizar las células a las que se va unida mediante la radiación UV. La detección de la GFP permite determinar la proliferación de los PERVs a partir de las células i-HEK293T-GFP. Mediante esta técnica, se ha podido ver que la propagación de los PERVs se mantiene activa en estas células humanas infectadas (Niu et al. 2017).

Existe un riesgo potencial en la transmisión de los retrovirus endógenos porcinos, tanto del subtipo PERV-A, como del subtipo PERV-B, ambos subtipos que demuestran un tropismo por células humanas. Por tanto, podría existir un riesgo de infección entre seres humanos si estos desarrollan una infección de PERVs tras recibir un xenoinjerto porcino, pero esto aún no ha podido demostrarse.

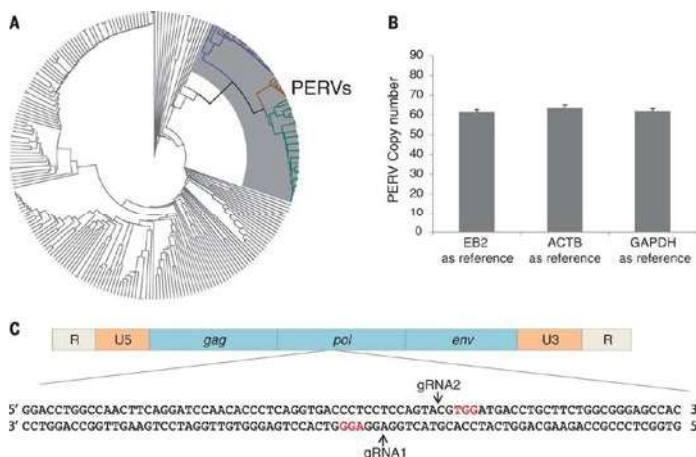


Se ha demostrado que las células de la línea celular i-HEK293T-GFP pueden transmitir los PERVs a células humanas embrionarias de riñón salvajes o WT, “WT HEK293”, es decir, que no han sido modificadas genéticamente, cuando se cultivan conjuntamente durante 2 semanas (Niu et al. 2017). Esto demuestra que la transmisión intercelular se ha demostrado como un mecanismo posible de transmisión de PERVs entre células humanas.

Se ha demostrado que los PERVs pueden integrarse en el genoma humano en un cultivo celular. Se han observado uniones de PERVs en el genoma humano sobrerrepresentadas en las regiones activas de la cromatina (Moalic, Y. et al. 2006).

Aún no ha podido demostrarse que los PERVs puedan transmitirse a seres humanos en un entorno clínico. Debido a motivos éticos en torno a la realización de experimentos científicos que conciernen al ser humano, existe una prohibición en algunos países que impide la realización de estas investigaciones usando al ser humano como modelo para investigar la transmisión en vivo de los PERVs.

(<https://oir.nih.gov/sourcebook/ethical-conduct/special-research-considerations/human-stem-cell-use/human-embryo-research-cloning-prohibitions>).



**A:** Árbol filogenético que muestra los retrovirus endógenos presentes en el genoma del cerdo. Los PERVs están coloreados de azul.

**B:** Determinación del número de copias de PERVs en células de la línea celular PK15 (mediante ddPCR). Se estima una detección de 62 copias del pol de genes de PERVs. Tomando como referencia 3 genes distintos: EB2, ACTB, GAPDH. **C:** Se han diseñado 2 guías de ARN (gRNA) para el pol de genes de PERVs. Sus secuencias PAM están marcadas en rojo. Imagen extraída de Yang et al. 2015).

### 5.5.2. Uso de CRISPR-Cas9 para inactivar los genes implicados en los PERVs

Debido a la capacidad del sistema CRISPR-Cas 9 para producir modificaciones múltiples en el genoma y de manera simultánea, se ha conseguido actuar sobre los genes del genoma responsables de los PERVs y de esta manera inactivarlos. Mediante este método se han

conseguido generar 2 líneas celulares a las que se ha silenciado la actividad de los genes implicados en los PERVs:

- Se ha creado en un cultivo celular una población de células epiteliales renales porcinas con una inactivación de los genes del genoma involucrados en la actividad de los PERVs (Yang et al. 2015). Esta línea celular se ha denominado PK15.
- También se ha creado una línea celular primaria porcina de fibroblastos fetales, en la que se ha silenciado la actividad de los PERVs. Esta línea celular se ha denominado FFF3 (Niu et al. 2017).

### 5.5.3. Creación de cerdos futuros donadores de órganos desprovistos de PERVs

A partir de esta línea celular FFF3 desprovista de la actividad PERV, se han conseguido producir embriones porcinos mediante la transferencia nuclear de células somáticas (SCNT) (Niu et al. 2017). Esta técnica permite clonar las células de una línea celular y dar lugar a embriones. Los embriones que se obtienen mediante el uso de esta técnica se transfieren posteriormente a cerdas nodrizas, que darán lugar a lechones con una silenciación de los genes responsables de los PERVs en su genoma, y serán los futuros cerdos donadores de órganos.

Los lechones nacidos con éxito mediante este procedimiento mantienen el número de copias en el genoma de genes involucrados con los PERVs, por lo que no se produce reinfección de PERVs en los lechones nacidos. El ARN de los tejidos de estos cerdos generados con éxito siguen manteniendo la inactivación de los genes. Esto constata la eficacia del procedimiento de la modificación genética mediante el uso de CRISPR-Cas 9 para producir cerdos sin copias funcionales de los PERVs.

La producción de cerdos con inactividad de los PERVs es sólida en ese sentido. Se están llevando a cabo estudios de larga duración para monitorizar el efecto de la desactivación de los PERVs en el genoma y la edición de genes en estos animales, a medida que vayan madurando y creciendo.

#### 5.5.4. Inconvenientes de la modificación del genoma para inactivar los PERVs

El uso de endonucleasas, como la endonucleasa Cas-9, para realizar cortes múltiples en el genoma de manera simultánea, desencadena daños en el ADN, como una senescencia inducida en las células o una apoptosis de estas. También puede generar anomalías cromosómicas en las células que han sido modificadas genéticamente, como deleciones entre los cortes de la doble cadena del ADN (Zhang et al. 2015).

Existe una correlación entre los lugares en los que se producen escisiones en el genoma y los lugares en los que se ha producido una traslocación de pares de bases. Esto sugiere una “toxicidad” directa del uso del sistema CRISPR-Cas 9 sobre el genoma (Zhang et al. 2015).

Se han planteado estrategias anti-apoptóticas, para evitar este fenómeno. Se ha empleado un cóctel anti-apoptótico que disminuye las alteraciones que se producen en las clones de células derivados de líneas celulares modificadas genéticamente. Este cóctel contiene el inhibidor p53, un factor de crecimiento de fibroblastos (bFGF), y la molécula anti-apoptótica Pifithrin Alpha (Niu et al. 2017):

Con el uso de este cóctel anti-apoptótico, se pueden solucionar los inconvenientes derivados del uso de endonucleasas y del método de CRISPR usado para inactivar los PERVs en el genoma, y de esta manera, se han conseguido mejorar las tasas en la inactivación de los PERVs de los clones de una población de la línea celular FFF3. Esta podría ser la solución a las bajas tasas de inactivación conseguida en las células clonadas y las bajas tasas de embarazo.

## 5.6 FORMACIÓN DE “QUIMERAS ANIMALES” Y OBTENCIÓN DE ÓRGANOS PARA TRASPLANTES

La formación de quimeras animales entre la especie porcina y el ser humano se ha planteado como una solución ante la carencia de órganos en el ámbito de los trasplantes. La posibilidad de desarrollar células, tejidos y órganos humanos en un organismo porcino, permitiría la disponibilidad de una fuente de órganos para ser trasplantados a los seres humanos, con la ventaja de evitar los impedimentos que suponen el uso de xenoinjertos porcinos: el rechazo inmunitario ante los órganos porcinos, y el riesgo de transmisión de los PERVs.

La generación de quimeras entre diferentes especies animales ya ha sido posible entre ratones y ratas (Kobayashi et al. 2010). La formación de quimeras animales es más eficiente entre animales de la misma familia que entre especies animales más diferentes, ya que las líneas evolutivas de estas especies no divergieron de manera tan acusada entre ellas como las del ser humano y la especie porcina (Cohen et al. 2018). La mayor distancia evolutiva entre los seres humanos y los cerdos puede hacer más complicada la formación de quimeras por incompatibilidades moleculares (Kobayashi et al. 2010).

Para poder generar quimeras entre 2 especies animales diferentes, es necesario la obtención de (Wu et al. 2016)a :

- **Células madre pluripotenciales** que tengan la capacidad de madurar y diferenciarse en todas las líneas celulares. La masa celular interna de las células madre pluripotenciales servirá de línea germinal para el desarrollo de los tejidos y órganos.
- **Blastocistos o embriones** del animal receptor que alberguen el desarrollo y diferenciación de la línea germinal.

Sin embargo, no solo existe un tipo de células madre pluripotenciales, sino que existen varios tipos con diferentes capacidades para la formación de quimeras entre especies animales (Wu et al 2016)a :

- **Células madre embrionarias o ESCs:** obtenidas en la fase de pre-implantación de los blastocistos. Sólo han podido demostrar capacidad para contribuir de manera funcional a la formación de quimeras en roedores. En los seres humanos no han demostrado esa capacidad (Wu et al. 2016)a.
- **Células madre epiblasticas o EpiS:** obtenidas de la fase de post-implantación de los blastocistos. Derivadas del epiblasto del blastocisto. Las células epiSCS tiene mayor capacidad para diferenciarse en los diferentes tejidos y órganos pero son más difíciles de manejar y de clonarse, pues necesitan unas condiciones de cultivo muy específicas. (Wu et al. 2015)b. Han demostrado en humanos capacidad in vitro para contribuir de manera a la formación de quimeras con otras especies animales (Huang et al. 2012).
- **Células de la cresta neural o NCC:** Células NCC humanas contribuyeron al desarrollo del SNC de ratas a las que se les inyectó en el estado de feto (Griswold et

al. 2012).

Es necesario conseguir células madre pluripotenciales humanas con la misma capacidad para formar quimeras que han mostrado las células ESC de roedores. Estas células en roedores presentan características como: mejor eficiencia de clonación, mayor facilidad para editar el genoma, y potencial para generar quimeras animales (Wu et al 2016)b.

Las células madre pluripotenciales humanas se pueden obtener de (Wu et al. 2016)b:

- De la masa celular interna de **blastocistos** derivados del estado de pre-implantación.
- Inducción de **células madre pluripotenciales o iPSC**: Mediante reprogramación nuclear de células somáticas a través la transferencia nuclear de células somáticas o SCNT (reprogramación celular) a partir de células derivadas de la fase de post-implantación.

La creación de células madre pluripotenciales inducidas o iPSC permitiría disponer de células madre pluripotenciales de cada individuo, con capacidad de diferenciarse en cualquier tipo celular, además de la capacidad de proliferar de manera infinita. Es decir, obtener células madre derivadas de cualquier tejido del organismo del propio paciente humano. Lo que permitiría la creación de tejidos y órganos “personalizados” a cada paciente.

### 5.6.1. “Complementación blastocitaria” entre especies

Se podría sacar ventaja de la capacidad de las células humanas pluripotenciales o hPSC para desarrollarse y diferenciarse en un organismo vivo de un cerdo que sirva como futuro donador de órganos (Wu et al. 2016)b.

En la formación de las quimeras entre los seres humanos y el cerdo, es necesario inhibir los genes del genoma del cerdo responsables del desarrollo del órgano que se quiere sustituir (Wu et al. 2016)b. Es necesario interrumpir los mecanismos genéticos involucrados en la diferenciación y desarrollo del órgano en cuestión, para dar lugar a un animal con una carencia en dicho órgano, y usarlo para desarrollar en su lugar el órgano del ser humano, que será el futuro receptor de un xenoinjerto (Huang et al. 2015).

Para interrumpir los mecanismos genéticos implicados y maduración celular, se pueden generar knockouts en los genes implicados del genoma porcino en la diferenciación celular de cada línea celular. Aprovechando esta carencia para sustituirla con células madre pluripotenciales humanas que mantengan intacta su capacidad para diferenciarse y madurar, se podrán obtener tejidos y órganos humanos desarrollados en el organismo del cerdo. Este proceso se conoce como complementación blastocitaria (Freedman, B.S. 2018).

Es necesario que las células madre pluripotenciales humanas tengan capacidad de desarrollarse con normalidad en un ambiente no humano. Se ha demostrado posible este proceso entre diferentes especies animales, logrando con éxito que células madre pluripotenciales de ratas, desarrollaran el epitelio pancreático funcional de ratones, a los que se les había producido knockout de los genes implicados en el desarrollo epitelial del páncreas en el estado de blastocisto (Kobayasi et al. 2010). Se ha logrado lo mismo con células madre embrionarias de rata para complementar los blastocistos de ratones a los que se les había generado knockout en los genes responsables del desarrollo y diferenciación del timo, y dieron lugar a ratones adultos con un timo funcional (Isotani et al. 2011).

Debido a la mayor distancia evolutiva entre el ser humano y la especie porcina, el proceso de “complementación blastocitaria” no es tan sencillo de conseguir, pues existen incompatibilidades moleculares y de afinidad, entre las moléculas humanas y las de la especie porcina (Kobayashi et al. 2010).

### 5.6.2. Potencial creación de futuras “Quimeras” entre el cerdo y el ser humano

Aún se desconoce si es posible la contribución de las células madre pluripotenciales humanas a la creación de quimeras viables entre el ser humano y la especie porcina. También se desconoce si la generación de tejidos y órganos humanos en cuerpos animales que aporten su propia vasculatura y nervios, podría ser viables para los xenotrasplantes. Y si estos podrían ser compatibles funcionalmente con la fisiología humana (Wu et al. 2016)a.

Aún quedan avances por alcanzar en el ámbito de las investigaciones en torno la creación de quimeras entre el ser humano y otras especies animales como el cerdo. No sólo por la falta de investigaciones, debido al recién empleo de técnicas para crear quimeras, sino por las

dificultades éticas que plantea la creación de quimeras animales. El bienestar de los animales empleados en las investigaciones ha sido motivo de preocupación durante décadas. Parte de la población no considera ético el uso de células madre embrionarias derivadas del ser humano. Y consideran la formación de quimeras como algo anti-natural. Además, una de las controversias existente es la posible “humanización” de los animales, y la posibilidad de conferir a los animales, características humanas como conciencia o inteligencia humana (Hyun et al. 2007).

## 6 CONCLUSIONES

La información adquirida permite obtener las siguientes conclusiones:

1. Las nuevas herramientas de edición del genoma como CRISPR-Cas9, están aportando numerosos avances en diversidad de ámbitos de interés humano, entre ellos, la terapia clínica humana.
2. La edición del genoma de los animales domésticos ha permitido estudiar el funcionamiento de multitud de genes de especies animales, que han aportado beneficios para los seres humanos en el ámbito de la terapia médica, y en el ámbito de la producción animal, que beneficia finalmente al ser humano.
3. La modificación del genoma de los animales con herramientas de ingeniería genética permite eliminar las barreras que suponen el uso de xenoinjertos de otras especies animales, como el cerdo, entre ellas: la transmisión de retrovirus endógenos porcinos o PERVs, y el rechazo producido por el sistema inmunitario del ser humano ante los xenoinjertos.
4. La creciente escasez de órganos a nivel mundial para ser trasplantados a los seres humanos se puede beneficiar de las nuevas tecnologías de edición genética, ya que la creación de “Quimeras animales” entre la especie porcina y el ser humano haría posible el desarrollo de células, tejidos y órganos humanos en el organismo de un animal vivo adulto.
5. El cerdo ha demostrado ser la especie doméstica más beneficiosa para los seres humanos por sus similitudes moleculares, fisiológicas, ciclo vital, anatómicas, de tamaño de órganos, además de su eficiencia para la producción de camadas.

6. Todavía quedan muchas incógnitas por resolver en cuanto al funcionamiento de los mecanismos genéticos que regulan multitud de vías. Los continuos estudios en estas áreas de investigación prometen futuros descubrimientos de gran interés que resolverían las incógnitas aún existentes.

## 7 CONCLUSIONS

From all the synthesized information we could obtain these conclusions:

1. Emerging genetic engineering tools, such as CRISPR-Cas9, are providing numerous advances in many of areas of human interest, such as human clinical therapy.
2. Genome editing of domestic animals has enabled the study of the behavior of lots of genes from different animal species, that has contributed to the benefit of humans in medical therapy, as well as in livestock production, which ultimately benefits human beings.
3. The use of genetic engineering methods for the manipulation of animals' genome, allows the elimination of the boundaries that involve the use of xenografts derived from other animal species, such as the pig. Among them: transmission of porcine endogenous retroviruses (PERVs), and immune rejection caused by the human's immune system against xenografts.
4. The growing organ shortage at a global scale for transplantation, may be solved by the use of new genome editing technologies, since the generation of "Interspecies chimeras" between porcine animals and humans, would make possible the development of human cells, tissues, and organs, into an animal adult living body.
5. Swine has shown to be the most advantageous domestic animal for human beings, due to their numerous molecular, physiological, life cycle, anatomical, organ size similarities, in addition to their ability to give birth to offspring.
6. There are still many questions to answer, concerning the functioning of some of the genetic mechanisms that control lots of molecular pathways. Continuous scientific research on those scientific areas, are promising new significant scientific findings, which could lead to resolve the answers still existing.



## 8 VALORACIÓN PERSONAL

La realización de este trabajo me ha permitido conocer la gran amplitud que abarca la investigación en torno al uso de herramientas de ingeniería genética, y en general en torno a la modificación del genoma humano y animal. Siempre he sentido un gran interés por la investigación científica, y en especial por la genética. Gracias al trabajo que he realizado bajo la tutoría de Pedro Muniesa y María Climent, he conseguido que me guste aún más la investigación científica, y la genómica. Ya que, el realizar este trabajo, ha permitido darme cuenta del inmenso trabajo que hay detrás de cada pequeño descubrimiento científico.

Sobre el tema en el que he enfocado mi trabajo, los xenotrasplantes, y la posibilidad de formar quimeras animales, pese a que puede sonar de ciencia ficción o algo irrealizable, parece ser una potencial solución futura para el problema de escasez de órganos a nivel mundial para los humanos. Además de aportar muchos otros beneficios para tratar enfermedades humanas.

Todos estos descubrimientos no habrían sido posibles sin la aportación de los animales. Los seres humanos nos hemos beneficiado de los animales durante la mayor parte de nuestra historia para poder sobrevivir, y lo seguiremos haciendo seguramente de por vida. Es de valorar su aportación a la mejoría de las condiciones de vida de los seres humanos.

Gracias a la existencia de plataformas de búsqueda como PubMed, la información disponible, no solo sobre el tema en cuestión, sino sobre infinidad de temas, es inmensa. Lo que voy a tener muy en cuenta a partir de la realización de este trabajo, para adquirir conocimientos de manera libre, sobre cualquier tema científico de interés.

## 9 Bibliografía

Ahrens, H.E., Petersen, B., Herrmann, D., Lucas-Hahn, B., Lucas-Hahn, A., Hassel, P., Ziegler, M., Kues, W.A., Baulain, U., Baars, W., Schwitzer, R., Denner, J., Rataj, D., Werwitzke, S., Tiede, A., Bongoni, A.K., Garimella, P.S., Despont, A., Rieben, R., Niemann, H. (2015)a. sgRNA mediated knockdown of tissue factor expression in pigs for xenotransplantation. *Am J Transplantation*. 2015; 15: 1407-1414. Doi: 10.1111/ajt.13120.

Ahrens, H.E., Petersen, B., Ramackers, W., Petkov, S., Hermann, D., Hauschild-Quintern, J., Lucas-Hahn, A., Hassel, P., Ziegler, M., Baars, W., Bergmann, S., Schwitzer, R., Winkler, M., Niemann, H. (2015)b. *Transplantation*. 2015 July; 1: e23. Doi: 10.1097/TXD.0000000000000553.

Bi, Y., Hua, Z., Liu, X., Hua, W., Ren, H., Xiao, H., Zhang, L., Li, L., Wang, Z., Laible, G., Wang, Y., Dong, F., Zheng, X. (2016). Isozygous and selectable marker-free MSTN knockout cloned pigs generated by the combined use of CRISPR/Cas9 and Cre/LoxP. *Sci Rep*. 2016; 6: 31729. Doi: 10.1038/srep31729.

LAURA EGUIARA SALAZAR  
CRISPR Y TRANSGÉNESIS EN ANIMALES DOMÉSTICOS

- Burdorf, L., Stoddard, T., Zhang, T., Rybak, E., Riner, A., Avon, C., Avon, C., Laaris, A., Cheng, X., Sievert, E., Braileanu, G., Newton, A., Phelps, C.J., Ayares, D., Azimzadeh, A.M., Pierson III, R.N. (2014). Expression of human CD46 modulates inflammation associated with GalTKO graft xenograft injury. *Xenotransplantation*. 2014 May; 14(5): 1084-1095. Doi: 10.1111/ajt.12673.
- Burdorf, L., Riner, A., Rybak, E., Salles, II., De Meyer, S.F., Shah, A., Quinn, K.J., Harris, D., Zhang, T., Parsell, D., Ali, F., Schwartz, E., Kang, E., Cheng, X., Sievert, E., Zhao, Y., Braileanu, G., Phelps, C.J., Ayares, D.L., Deckmyn, H., Pierson III, R.N., Azimzadeh, A.M. (2016). *Xenotransplantation*. 2016 May; 23(3): 222-236. Doi: 10.1111/xen.12236.
- Byrne, G., Ahmad-Villiers, S., Du, Z., McGregor, C. (2018). B4GalNT2 and xenotransplantation: a newly appreciated xenogeneic antigen. *Xenotransplantation*. 2018 March 13; 25: e12394. Doi: 10.1111/xen.12394.
- Choi, S.H., Yoon, C.H., Lee, H.J., Kim, H.P., Kim, J.M., Che, J., Roh, K.M., Choi, H.J., Kim, J., Hwang, E., Park, C., Kim, M.K. (2018). Long-term safety outcome of systemic immunosuppression in pig-to-nonhuman primate corneal xenotransplantation. *Xenotransplantation*. 2018; 25(4): e12442. Doi: 10.1111/xen.12442.
- Chuong, E.B., Elde, N.C., Feschotte, C. (2016). Regulatory evolution of innate immunity through co-option of endogenous retroviruses. *Science*. 2016; 351: 1083-1087. Doi: 10.1126/science.aad5497.
- Cohen, M.A., Markoulaki, S., Jaenish, R. (2018). Match developmental timing of donor cells with the host is crucial for chimera formation. *Stem cell report*. 2018 May 8; 10(5): 1445-1452. Doi: 10.1016/j.stemcr.2018.03.004.
- Cowan, P.J., Cooper, D.K.C., d'Apice, A.J.F. (2014). Kidney xenotransplantation. *Kidney Int*. 2014 Feb; 85(2): 265-275. Doi: 10.1038/ki.2013.381.
- Denner, J., Tönjes, R.R. (2012). Infection barriers to successful xenotransplantation focusing on porcine endogenous retroviruses. *Clin. Microbiol. Rev.* 2012 April; 25(2): 318-343. Doi: 10.1128/CMR.05011-11.
- Denner, J. (2016)a. How active are porcine endogenous retroviruses? *Viruses*. 2016 August; 8(8): 215. Doi: 10.3390/v8080215.
- Denner, J. (2016)b. Expression and function of endogenous retroviruses in the placenta. *Apmis*. 2016; 124: 31-43. Doi: 10.1111/apm.12474.
- Fischer, K., Kraner-Scheiber, S., Petersen, B., Rieblinger, B., Buermann, A., Flisikowska, T., Flisikowski, K., Christan, S., Edlinger, M., Baars, W., Kurome, M., Zakhartchenko, V., Kessler, B.,
- Fishman, J.A., Patience C. (2004). Xenotransplantation: infectious risk revisited. *Am J Transplantation*. 2004; 4: 1383-1390. Doi: 10.1111/j.1600-6143.2004.00542.x.
- Fishman, J.A., Scobie, L., Takeuchi, Y. (2012). Xenotransplantation-associated infectious risk: a WHO consultation. *Xenotransplantation*. 2012; 19(2): 72-81. Doi: 10.1111/j.1399-3089.2012.00693.x.
- Fishman, J.A. (2018). Infectious disease risks in xenotransplantation. *Am J Transplant*. 2018; 18: 1857-1864. Doi: 10.1111/ajt.14725.
- Freedman, B.S. (2018). Hopes and difficulties for blastocyst complementation. *Nephron*. 2018; 138(1): 42-47. Doi: 10.1159/00048037.
- Galili, U. (2013). Anti-Gal: an abundant natural human antibody of multiple pathogeneses and clinical benefits. *Immunology*. 2013 April 08; 140: 1-11. Doi: 10.1111/imm.12110.
- Griswold, S.L., Lwigale, P.Y. (2012). Analysis of neural crest migration and differentiation of by cross-species transplantation. *J Vis Exp*. 2012 Feb 7; 60: 3622. Doi: 10.3791/3622.
- Hyun, I., Taylor, P., Testa, G., Dickens, B., Jung, K.W., McNab, A., Robertson, J., Skene, L., Zoloth, L. (2007). Ethical standards for human-to-animal chimera experiments in stem cell research. *Cell Stem Cell*. 2007 Aug 16; 1(2): 159-163. Doi: 10.1016/j.stem.2007.07.015.
- Huang, Y., Osorno, R., Tsakiridis, A., Wilson, V. (2012). In vivo differentiation potential of epiblast stem cells revealed by chimeric embryo formation. *Cell Reports*. 2012 December 27; 2: 1571-1578. Doi: 10.1016/j.celrep.2012.10.022.
- Huang, G., Ye, S., Zhou, X., Liu, D., Ying, Q.L. (2015). Molecular basis of embryonic stem cell self-renewal: from signaling pathways to pluripotency network. *Cell Mol Life Sci*. 2015 May; 72(9): 1741-1757. Doi: 10.1007/s00018-015-1833-2.
- Isotani, A., Hatayama, H., Kaseda, K., Ikawa, M., Okabe, M. (2011). Formation of a thymus from rat ES cells in xenogeneic nude mouse – rat ES chimeras. *Genes Cells*. 2011 Apr; 16(4): 397-405. Doi: 10.1111/j.1365-2443.2011.01495.x.
- Kimsa, M.C., Strzalka-Mrozik, B., Kimsa, M.W., Gola, J., Nicholson, P., Lopata, K., Mazurek, U. (2014). Porcine

LAURA EGUIARA SALAZAR  
CRISPR Y TRANSGÉNESIS EN ANIMALES DOMÉSTICOS

- endogenous retroviruses in xenotransplantation – molecular aspects. *Viruses*. 2014 May 13; 6: 2062-2083. Doi: 10.3390/v6052062.
- Knosalla, C. (2018). Success for cross-species heart transplants. *Nature* 564. 2018; 352-353. Doi: 10.1038/d41586-018-07419-5.
- Kobayashi, T., Yamaguchi, T., Hamanaka, S., Kato-Itoh, M., Yamazaki, Y., Ibata, M., Sato, H., Lee, Y-S., Usui, J-i., Knisely, A.S., Hirabayashi, M., Nakauchi, H. (2010). Generation of rat pancreas in mouse by interspecific blastocyst injection of pluripotent stem cells. *Cell* 142, 787-799. 2010 September 3. Doi: 10.1016/j.cell.2010.07.039.
- Kolber-Simonds, D., Lai, L., Watt, S., Denaro, M., Arn, S., Augenstein, M., Betthausen, J., Carter, D., Greenstein, J.L., Hao, Y., Im, G., Liu, Z., Mell, G.D., Murphy, C.N., Park, K., Rieke, A., Ryan, D.J.J., Sachs, D.H., Forsberg, E.J., Prather, R.S., Hawley, R.J. (2004). Production of alfa-1,3-galactosyltransferase nulo pigs by means of nuclear transfer by transfer with fibroblasts bearing loss of heterozygosity mutations. *PNAS*. 2004 May 11; 101(19): 7335-7340. Doi: 10.1073/pnas.0307819101.
- Längin, M., Mayr, T., Reichart, B., Michel, S., Buchholz, S., Guethoff, S., Dashkevich, A., Baehr, A., Egerer, S., Bauer, A., Mihalj, M., Panelli, A., Issl, L., Yang, J. et al. (2018). Consistent success in life-supporting porcine cardiac xenotransplantation. *Nature* 564. 2018 December 05; 430-433. Doi: 10.1038/s41586-018-0765-z.
- Lee, J.G., Sung, Y.H., Baek, I-J. (2018). Generation of genetically-engineered animals using engineered endonucleases. *Arch. Farm. Res.* 2018; 41: 885-897. Doi: 10.1007/s12272-018-1037-z.
- Lin, S.S., Weidner, B.C., Byrne, G.W., Diamond, L.E., Lawson, J.H., Hoopes, C.W., Daniels, L.J., Daggett, C.W., Parker, W., Harland, R.C., Davis, R.D., Bollinger, R.R., Logan, J.S., Platt, J.L. (1998). The role of antibodies in acute vascular rejection of pig-to-baboon cardiac transplant. *J Clin Invest*. 1998 April 15; 101(8): 1745-1756. Doi: 10.1172/JCI2134.
- Lunney, J.K. (2007). Advances in swine biomedical model genomics. *Int. J. Biol. Sci.* 2007 Feb 10; 3(3): 179-184. Doi: 10.7150/ijbs.3.179.
- Moalic, Y., Blanchard, Y., Félix, H., Félix, H., Jestin, A. (2006). Porcine endogenous retrovirus integration sites in the human genome: features in common with those murine leukemia virus. *J Virol*. 2006 Nov; 80(22): 10980-10988. Doi: 10.1128/JVI.00904-06.
- Niemann, H., Petersen, B. (2016). The production of multi-transgenic pigs: update and perspectives for xenotransplantation. *Transgenic Res.* 2016 January 28; 25: 361-374. Doi: 10.1007/s11248-016-9934-8.
- Niu, D., Wei, H-J., Lin, L., George, H., Wang, T., Lee, I-H., Zhao, H-Y., Wang, Y., Kan, Y., Shrock, E., Lesho, E., Wang, G., Luo, Y., Qing, Y., Jiao, D., Zhao, H., Zhou, X., Wang, S., Wei, H., Güell, M., Church, G.M., Yang, L. (2017). Inactivation of porcine endogenous retrovirus in pigs using CRISPR-Cas9 (2017). *Science* 357. 2017 Sept 22; 357: 1303-1307. Doi: 10.1126/science.aan4187.
- Padler-Karavani, V., Varki, A. (2011). Potential impact of the non-human sialic acid N-Glycolylneuraminic acid on transplant rejection risk. *Xenotransplantation*. 2011; 18(1): 1-5. Doi: 10.1111/j.1399-3089.2011.00622.x.
- Patel, M.S., Louras, N., Vagefi, P.A. (2017). Liver Xenotransplantation. *Curr Opin Organ Transplant*. 2017 Dec; 22(6): 535-540. Doi: 10.1097/MOT.0000000000000459.
- Perleberg, C., Kind, A., Schnieke, A. (2018). Genetically engineered pigs as models for human disease. *Dis Model Mech*. 2018 Jan 1; 11(1): dmm030783. Doi: 10.1242/dmm.030783.
- Petersen, B. (2017). Basics of genome editing technology and its application in livestock species. *Reprod Dom Anim*. 2017; 52(3): 4-13. Doi: 10.1111/rda.13012.
- Rogers, C.S. (2016). Genetically engineered livestock for biomedical models. *Transgenic Res.* 2016 January 28; 25: 345-359. Doi: 10.1007/s11248-016-9928-6.
- Roussel, J.C., Moran, C.J., Salvaris, E.J., Nandurkar, H.H., d'Apice, A.J.F., Cowan, P.J. (2008). Pig thrombomodulin binds human thrombin but is a poor cofactor for activation of human protein C and TAFI. *Am J Transplantation*. 2008; 8: 1101-1112. Doi: 10.1111/j.1600-6143.2008.02210.x.
- Scalea, J., Hanecamp, I., Robson, S.C., Yamada, K. (2012). T-cell-mediated immunological barriers to xenotransplantation. *Xenotransplantation*. 2012; 19(1): 23-30. Doi: 10.1111/j.1399-3089.2011.00687.x.
- Scobie, L., Padler-Karavani, V., Le Bas-Bernardet, S., Crossan, C., Blaha, J., Matouskova, M., D Hector, R., Cozzi, E., Vanhove, B., Charreau, B., Blanco, G., Bourdais, L., Tallacchini, M., et al. (2013). Long-term IgG response to porcine Neu5Gc antigens without transmission of PERV in burn patients treated with porcine skin xenografts. *J Immunol*. 2013 Sept 15; 191(6): 2907-2915. Doi: 10.4049/jimmunol.1301195.
- Tandukar, S., Hariharan, S. (2018). Xenotransplantation. *Organogenesis*. 2018; 14(4):159-162. Doi: 10.1080/15476278.2018.1517508.

LAURA EGUIARA SALAZAR  
CRISPR Y TRANSGÉNESIS EN ANIMALES DOMÉSTICOS

- Weiner, J., Yamada, K., Ishikawa, Y., Moran, S., Etter, J., Shimizu, A., Smith, R.N., Sachs, D.H. (2010). Prolonged survival of GalT-KO GalT-KO swin skin on baboons. *Xenotransplantation*. 2010; 17(2): 147-152. Doi: 10.1111/j.1399-3089.2010.00576.x.
- Weiss, R.A. (2013). On the concept and elucidation of endogenous retroviruses. *Philos. Trans.R.Soc.Lond.B.Biol.Sci*. 2013; 368: 20120494. Doi: 10.1098/rstb.2012.0494.
- Whitelaw, C.B.A., Sheets, T.P., Lillico, S.G., Telugu, B.P. (2016). Engineering large animal models of human disease. *J Pathol*. 2016; 238: 247-256. Doi: 10.1002/path.4648.
- Wijkstrom, M., Iwase, H., Paris, W., Hara, H., Ezzelarab, M., Cooper, D.K. (2017). Renal xenotransplantation: experimental progress and clinical prospects. *Kidney Int*. 2017 April; 91(4): 790-796. Doi: 10.1016/j.kint.2016.08.035.
- Wu, J., Greely, H.T., Jaenisch, R., Nakauchi, H., Rossant, J., Izpisua Belmonte, J.C. (2016)a. Stem cells and interspecies chimaeras. *Nature*. 2016 December 1; 540: 51-59. Doi: 10.1038/nature20573.
- Wu, J., Izpisua Belmonte, J.C. (2016)b. Interspecies chimeric complementation for the generation of functional human tissues and organs in large animal hosts. *Transgenic Res*. 2016 January 28; 25: 375-384. Doi: 10.1007/s11248-016-9930-z.
- Wu, J., Platero-Luengo, A., Gil, M.A., Suzuki, K., Cuello, C., Morales-Valencia, M., Parrilla, I., Martínez, C.A., Nohalez, A., Roca, J., Martínez, E.A., Izpisua Belmonte, J.C. (2016)c. Generation of human organs in pigs via interspecies blastocyst complementation. *Reprod Dom Anim*. 2016; 51(2): 18-24. Doi: 10.1111/rda.12796.
- Wu, J., Platero-Luengo, A., Sakurai, M., Martínez, E.A., Ross, P.J., Izpisua Belmonte, J.C., et al. (2017). Interspecies Chimerism with Mammalian Pluripotent Stem Cells. *Cell*. 2017 January 26; Cell 168: 473-468. Doi: 10.1016/j.cell.2016.12.036.
- Xenotrasplantation 2.0. *Nat Biotechnol*. 2016 Jan; 34(1):1. Doi: 10.1038/nbt.3466.
- Yang, L., Güell, M., Niu, D., George, H., Lesha, E., Grishin, D., Aach, J., Shrock, E., Xu, W., Poci, J., Cortazio, R., Wilkinson, R.A., Fishman, J.A., Church, G. (2015). Genome-wide inactivation of porcine endogenous retroviruses (PERVs). *Science*. 2015 November 27; 350(6264): 1101-1104. Doi: 10.1126/science.aad1191.
- Yang, H., Wu, Z. (2018). Genome editing of pigs for agriculture and biomedicine. *Front. Genet*. 2018 September 04; 9: 360. Doi: 10.3389/fgene.2018.00360.
- Yeom, H-J., Koo, O.J., Yang, J., Cho, B., Hwang, J-I. et al. (2012). Generation and characterization of human Heme oxygenase-1 transgenic pigs. 2012; PLoS ONE. 7(10): e46646. Doi: 10.1371/journal.pone.0046646.
- Zhang, X-H., Tee, Tee, L.Y., Wang, X-G., Huang, Q-S., Yang, S-H. (2015). Off-target effects in CRISPR/Cas9-mediated genome engineering. *Molecular therapy-Nucleic Acids*. 2015; 4: e264. Doi: 10.1038/mtna.2015.37.
- Zeyland, J., Gawronska, B., Juzwa, W., Jura, J., Nowak, A., Slomski, R., Smorag, Z., Szalata, M., Wóznia, A., Lipinski, D. (2013). *J Appl Genetics*. 2013 June 19; (54): 293-303. Doi: 10.1007/s13353-013-0156-y.
- Eurotransplant International Foundation: <https://www.eurotransplant.org/cms/>
- Global observatory of Donation and Transplantation: <http://www.transplant-observatory.org/>