

La revolución en ingeniería genética: sistema CRISPR/Cas

The revolution in genetic engineering: CRISPR/Cas system

María Fernanda Lammoglia-Cobo,* Ricardo Lozano-Reyes,* César Daniel García-Sandoval,* Cynthia Michelle Avilez-Bahena,* Violeta Trejo-Reveles,* Rodrigo Balam Muñoz-Soto,* César López-Camacho‡

* Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey, Campus Ciudad de México.

‡ Universidad de Oxford, Departamento de Medicina Nuffield, Centro de Fisiología Celular y Molecular. Oxford, Reino Unido.

Dirección para correspondencia:
 Dr. en C. Rodrigo Balam Muñoz Soto
 Departamento de Biotecnología,
 Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey,
 Campus Ciudad de México,
 Calle del Puente Núm. 222,
 Col. Ejidos de Huipulco,
 Deleg. Tlalpan, 14380,
 México, D.F., México.
 Tel: (+5255) 5483 2020,
 ext. 1304
 E-mail: rbmunoz@itesm.mx

Recibido: 1 de octubre de 2015.
 Aceptado: 31 de marzo de 2016.

Este artículo puede ser consultado en versión completa en:
<http://www.medigraphic.com/rid>

Palabras clave: CRISPR/Cas, terapia génica, biología molecular, expresión génica, enfermedad degenerativa.

Key words: CRISPR/Cas, gene therapy, molecular biology, genetic expression, degenerative disease.

Resumen

Las repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente espaciadas (CRISPR, por sus siglas en inglés), junto con la endonucleasa Cas, forman el complejo CRISPR/Cas. Este sistema se descubrió como un mecanismo de defensa inmune presente en bacterias y arqueas, quienes incorporan ADN de patógenos, como bacteriófagos, entre secuencias palindrómicas repetidas y, posteriormente, generan un ARN llamado «ARN_{cr}» al transcribirse. En caso de una segunda infección, el ARN_{cr} acoplado con Cas reconoce el transcrito del patógeno y Cas degrada el ARNm de manera análoga al ARN de silenciamiento (ARN_{si}). Debido a su actividad como endonucleasa y capacidad de reconocimiento en secuencias específicas, el sistema CRISPR/Cas se ha aprovechado en la ingeniería genética para activar genes, reprimirlos, inducir mutaciones puntuales y cambiar secuencias mediante recombinación homóloga. CRISPR también se ha empleado para generar modelos murinos de enfermedades humanas y evaluar la fisiología celular mediante la activación o represión simultánea de diversos genes. En esta revisión se explica el funcionamiento del sistema CRISPR/Cas, se mencionan sus aplicaciones potenciales en terapia celular y genética, y se detallan las perspectivas a futuro de esta herramienta.

Abstract

CRISPRs (clustered regularly interspaced short palindromic repeat), along with the Cas endonuclease, form the CRISPR/Cas system. The system was discovered as a defense mechanism in bacteria and archaea, in which DNA from a pathogen—such as a bacteriophage—is incorporated between repeated palindromic sequences and later transcribed into an RNA known as crRNA. In a second infection, the crRNA coupled with Cas matches the pathogen's transcript sequence and Cas silences or degrades the mRNA in a similar mechanism as a silencing RNA (siRNA). Due to its endonuclease activity and its ability to recognize specific sequences, the CRISPR/Cas system has been used in genetic engineering to activate or repress genes, to induce point mutations, and to alter sequences through homologous recombination. CRISPR has also been used to establish accurate models of human disease in mice and to evaluate cellular physiology through the simultaneous activation or repression of various genes. In this review article, we include the mechanism of action of the CRISPR/Cas system, its potential applications in cell and gene therapy, and future perspectives.

Antecedentes

En la actualidad, una de las áreas de mayor desarrollo en la biología molecular y terapia génica es la edición genómica dirigida. Ésta emplea proteínas con dominios de unión a secuencias específicas de ADN y actividad nucleasa para su escisión. Estas técnicas se usan desde el desarrollo de modelos experimentales de estudio hasta la implementación de la terapia génica.

Los inicios de la edición genómica dirigida datan de 1970 con el método de reparación por recombinación homóloga (HDR, por sus siglas en inglés). Dicho método, aunque permite la manipulación precisa de genes, posee un proceso largo y complicado que no garantiza un resultado efectivo en todos los casos. Por ello, a partir de la necesidad de confiabilidad y eficiencia en la edición del genoma, recientemente se desarrollaron tecnologías más precisas como las nucleasas con dedos de zinc y la tecnología de TALENs (*transcription activator-like effector nucleases*). Por un lado, las nucleasas unidas a dedos de zinc se basan en un dominio Cys2His2, que reconoce un triplete específico según los residuos de la α hélice que se hayan elegido.¹ A su vez, la tecnología TALENs utiliza motivos de unión de ADN para dirigir a una nucleasa.² Mientras que los dedos de zinc reconocen tripletes de ADN, cada dominio de TALEN reconoce un solo nucleótido. Estas herramientas actualmente son de las más confiables y empleadas.

Aunque ambas herramientas presentan ventajas considerables (facilidad de localizar secuencias, diseño rápido y precisión al escindir), también son métodos costosos y, en ocasiones, su construcción resulta complicada. Por ello, el sistema CRISPR surge como una alternativa factible para lograr la edición del genoma: es de fácil diseño e introducción, más económico, rápido y eficiente al momento de localizar y modificar una secuencia. Por estos factores, CRISPR se ha convertido en uno de los sistemas con mayor potencial en la edición genómica y actualmente se estudian sus posibles aplicaciones en diversos ámbitos.

Descubrimiento del sistema CRISPR/Cas

En 1987, un grupo de investigación de la Universidad de Osaka observó secuencias repetidas de 29 nucleótidos altamente conservadas en el genoma de *Escherichia coli*.³ En primera instancia, se pensó que dichas secuencias eran ADN «basura»; sin embargo, diversos análisis bioinformáticos posteriores revelaron que las secuencias entre estos repetidos,

llamadas «espaciadoras», eran complementarias con secuencias de algunos fagos y virus que atacan a las bacterias. Esto sentó las bases para establecer que las bacterias poseían algo similar a un sistema inmune con memoria. Posteriormente, Koonin y Makarova propusieron que algunos organismos (principalmente las bacterias y arqueas) integran fragmentos del ADN de los fagos en su propio genoma y que, al transcribirse, reconocen las del nuevo virus y forman un complejo de doble cadena que detiene el proceso infectivo. Ello cobró aún más sentido al comparar estas secuencias, bautizadas como «CRISPR», con el silenciamiento génico por ARN interferente en eucariontes.⁴ Finalmente, en 2007, otro equipo demostró que *Streptococcus thermophilus* podía adquirir resistencia a un fago, ya que al ser expuesto a éste incorporaba un fragmento de la secuencia del intruso.⁵ Una vez definida la naturaleza de CRISPR, las investigaciones se centraron en establecer las moléculas involucradas en el procesamiento del ARN con la secuencia complementaria (ARNcr) y la formación del complejo CRISPR/Cas.⁶ Tiempo después, cuando se descubrió su actividad endonucleasa y la presencia de dos sitios de corte, además de la alta especificidad del ARNcr, se comenzó a plantear la posibilidad de utilizar a CRISPR/Cas como un sistema de edición genómica. Posee dos factores importantes para dicho propósito: una endonucleasa y una secuencia complementaria de reconocimiento. Hoy en día, este sistema es considerado entre los más eficientes y precisos, mientras que su potencial sigue siendo estudiado.

Mecanismos de acción para corte y reparación de secuencias en un sistema bacteriano

CRISPR/Cas es un mecanismo de defensa en bacterias y arqueas análogo al silenciamiento con ARN interferente en eucariontes, que identifica y degrada secuencias de ácidos nucleicos exógenos. Se compone de dos elementos: un ARN proveniente de la secuencia CRISPR, llamado «ARNcr», y la endonucleasa Cas. El ARNcr es el encargado de dirigir a Cas hacia su secuencia complementaria, donde Cas realiza el corte.

La secuencia CRISPR se compone de un líder o promotor y distintas secuencias espaciadoras (de 25 a 50 nucleótidos) flanqueadas por elementos repetidos, usualmente palindrómicos (de aproximadamente 32 nucleótidos). Un ejemplo de esta última es la reportada para *Escherichia coli* K-12: CGGTTTATCCCCGCTGGCGGGGAACAC.⁷

El primer paso en la respuesta inmunológica es la adquisición de secuencias espaciadoras tras la exposición al patógeno, ya sea material genético de un virus o un plásmido. Una vez que estas secuencias están en el citoplasma, la célula reconoce una secuencia conocida como motivo adyacente al protoespaciador (PAM) e incorpora los nucleótidos adyacentes al PAM como elemento espaciador junto al promotor en CRISPR. Durante este proceso, genera una copia de la secuencia repetida para que ambas queden flanqueando el nuevo fragmento (*Figura 1*).

En una segunda etapa, se transcribe el ARNcr. Se han identificado tres tipos de sistemas según las endonucleasas involucradas y el procesamiento del

ARNcr. En el sistema CRISPR I, se utiliza una cascada de caspasas para activar a Cas3; en CRISPR II, se activa Cas9 y en CRISPR III, se activa Cas6. En el presente artículo nos enfocaremos en el segundo, por ser el más empleado en ingeniería genética debido a la alta tasa de eficiencia de Cas9.

En el sistema CRISPR II se requiere adicionalmente un segundo ARN no codificante, llamado tracrARN, el cual es complementario a la secuencia palindrómica repetida. Una vez que finaliza la transcripción de CRISPR, el tracrARN forma un dímero con las secuencias repetidas. A su vez, una RNasa III reconoce este híbrido ARNcr/tracrARN y lo procesa para generar un transcrito maduro de aproximadamente

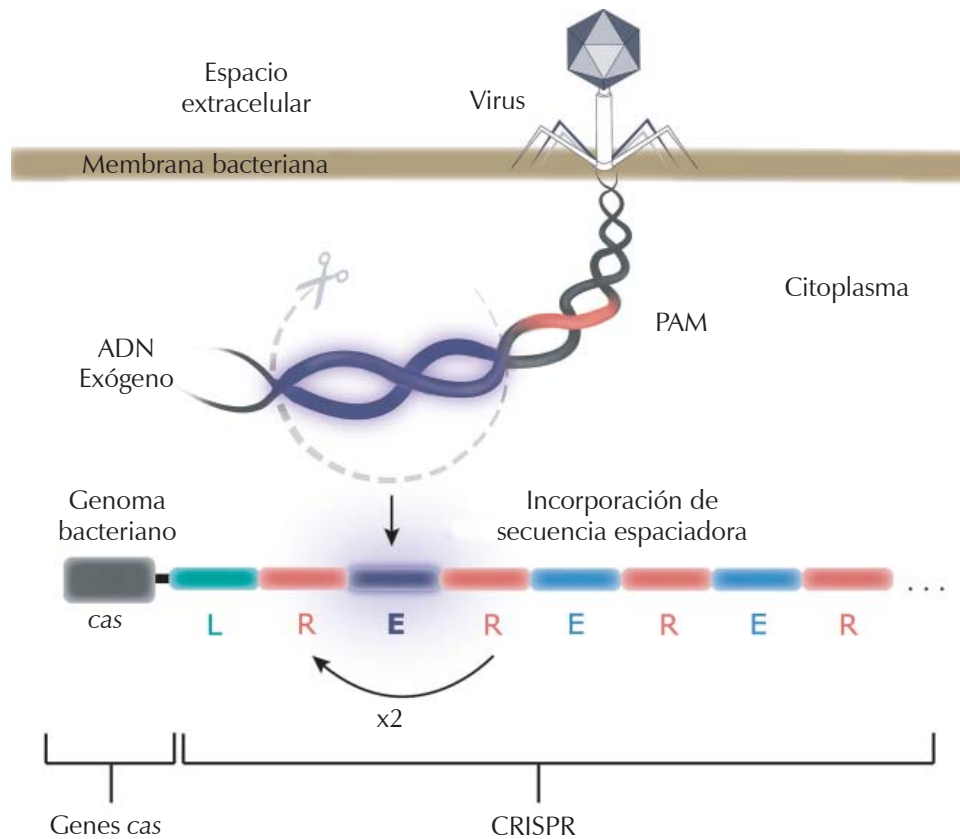


Figura 1. Incorporación de secuencia espaciadora al genoma bacteriano. Las bacterias generan una memoria inmunológica de exposiciones previas a patógenos al incorporar secuencias de los mismos a su genoma. En la imagen, un virus introduce su material genético al citoplasma bacteriano. La célula reconoce entonces una secuencia conocida como motivo adyacente al protoespaciador (PAM) e incorpora los nucleótidos adyacentes al PAM como una nueva secuencia espaciadora (E). Durante este proceso, duplica la secuencia repetida (R) para flanquear la espaciadora por ambos lados.

Dentro del genoma bacteriano, se encuentran los genes codificantes para la endonucleasa Cas (*cas*) y la secuencia de CRISPR. CRISPR se compone de un líder (L) y distintas secuencias espaciadoras (E) flanqueadas por los elementos repetidos (R), usualmente palindrómicos.

40 nucleótidos y un asa de doble cadena en 3' de 20 nucleótidos (Figura 2).⁸

En el tercer y último paso, Cas se asocia con el ARNcr maduro y forma el complejo CRISPR/Cas. El ARNcr será quien guíe al complejo hacia su blanco por medio del reconocimiento de la secuencia complementaria.

En caso de una segunda infección, la porción de la secuencia espaciadora del ARNcr maduro reconoce y forma un complejo ADN-ARN con el material exógeno.⁹ Este complejo es reconocido por los dos dominios de la enzima Cas: RuvC y HNH.¹⁰ Cada uno de los dominios corta una hebra distinta, por lo cual el proceso se conoce como *double strand break* (DSB).

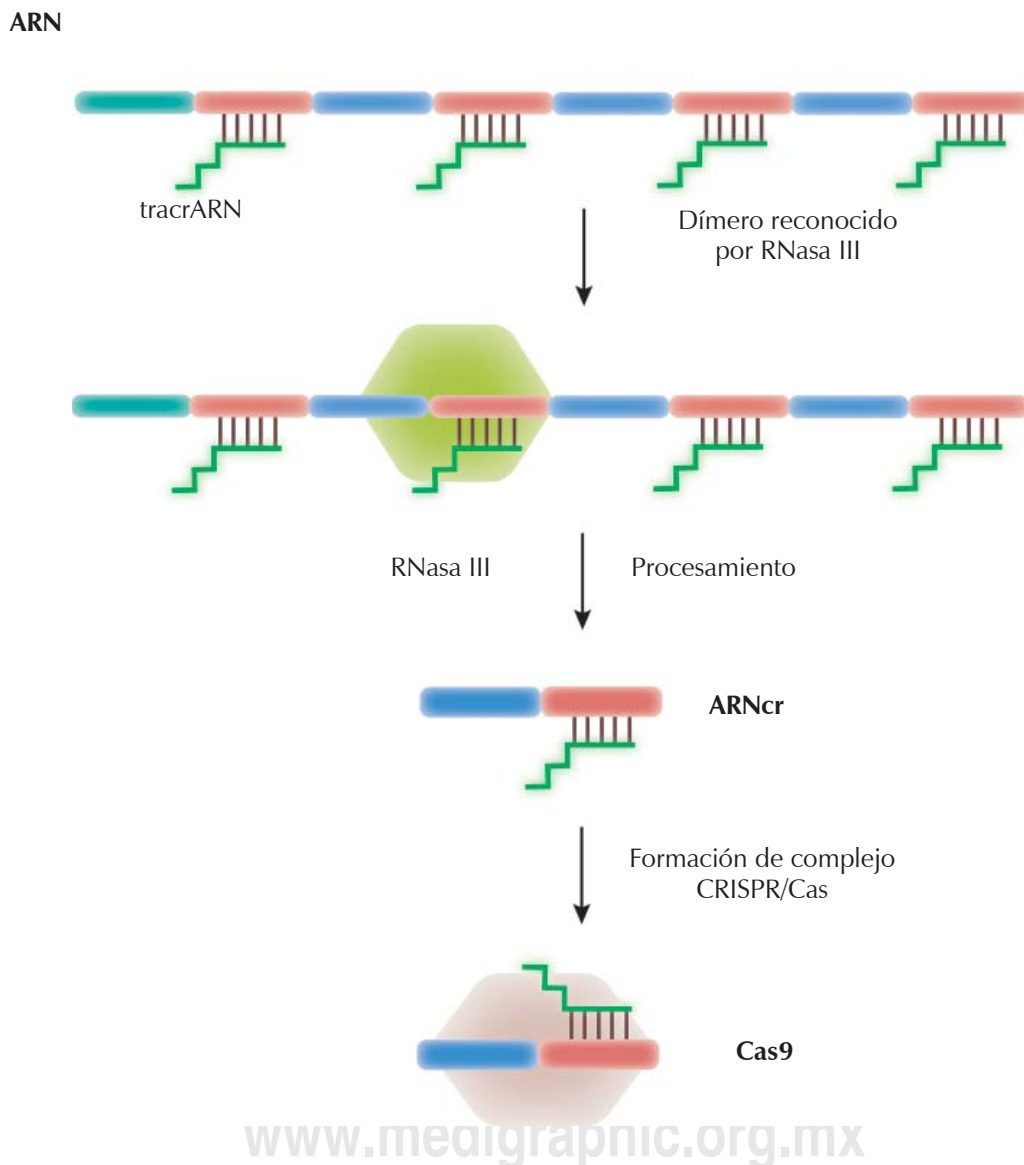


Figura 2. Formación del complejo CRISPR/Cas II. En la segunda etapa, se genera el ARNcr para acoplarse con la endonucleasa Cas. El sistema CRISPR/Cas II requiere de un segundo ARN no codificante, el tracrARN, que es complementario a la secuencia repetida. Al finalizar la transcripción de CRISPR, el tracrARN forma un dímero con las secuencias repetidas. Una RNasa III reconoce este híbrido ARNcr/tracrARN y lo procesa para generar un transcrito maduro con un asa de doble cadena en 3': el ARNcr. Cas9 recluta el ARNcr y forma el complejo CRISPR/Cas. El ARNcr será quien guíe al complejo hacia su blanco al reconocer la secuencia complementaria.

Existen dos formas de reparar estos cortes en ambas hebras: no homóloga, conocida como *non homologous endjoining* (NHEJ), y homóloga, conocida como *homology directed repair* (HDR). No obstante, NHEJ muchas veces resulta en inserciones o deleciones no deseadas dentro del genoma (codones de paro o cambios en el marco de lectura). Por su parte, para inducir HDR, se requiere la introducción de una secuencia que tenga un alto porcentaje de homología en sus extremos 5' y 3' (Figura 3).

Utilidad del sistema CRISPR/Cas para la edición de genomas

Debido a la precisión en cortes sitio-específicos, el sistema CRISPR/Cas es una gran alternativa para los métodos clásicos de la edición genómica dirigida. Aunque el objetivo original del sistema es el silenciamiento de secuencias, ciertas modificaciones han permitido adaptarlo para insertar, eliminar o generar mutaciones en las secuencias. Actualmente, existen plásmidos que

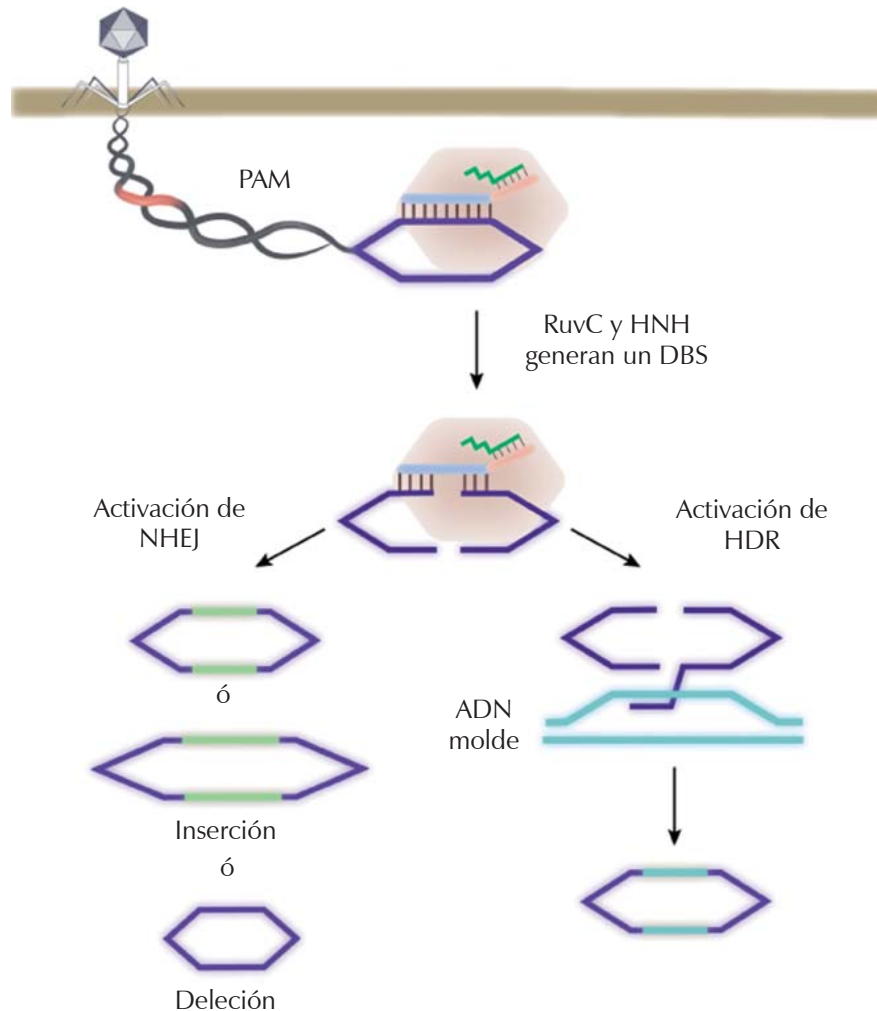


Figura 3. CRISPR/Cas como sistema de defensa. En caso de una segunda infección, la bacteria es capaz de generar el sistema CRISPR/Cas cuyo ARNcr reconozca y forme un complejo ADN-ARN con la secuencia exógena adyacente al motivo adyacente al protoespaciador (PAM). Este complejo es reconocido por los dominios RuvC y HNH de la enzima Cas, los cuales generan un corte en ambas hebras conocido como *double strand break* (DSB). La reparación de estos cortes puede realizarse de dos maneras: no homóloga (NHEJ) y homóloga (HDR). NHEJ resulta impreciso debido a que puede incorporar la misma cantidad de nucleótidos que se cortaron o generaron un cambio en el marco de lectura con inserciones o deleciones. HDR es posible al incluir un ADN molde con un alto porcentaje de homología en sus extremos 5' y 3'. La recombinación permite insertar, de esta forma, una secuencia específica.

incluyen tanto las secuencias de Cas como un análogo al complejo ARNcr/tracrARN, el ARN guía (ARNg) (*Cuadro I*). De esta forma, puede elegirse la secuencia complementaria y ensamblar el complejo completo dentro de una célula.

a. Inserción de genes por recombinación homóloga

La ventaja del uso de tecnologías basadas en ARN es la complementariedad que presenta con su blanco. El sistema CRISPR/Cas se dirige, pues, contra una secuencia específica e induce un corte en ambas cadenas de ADN.

Insertando, además, una secuencia con alta homología por los extremos 3' y 5' del sistema, CRISPR/Cas puede dirigirse hacia un locus del genoma en células humanas y murinas e inducir una reparación por HDR con una baja tasa de mutagénesis. También, el sistema es capaz de trabajar simultáneamente con varios genes al incluirse éstos en un solo arreglo de CRISPR.¹¹

Para optimizar la eficiencia y especificidad en la reparación por HDR, se generaron líneas transgénicas de *Drosophila melanogaster* con una expresión estable de Cas. Se insertaron un ADN de doble cadena, que funciona como donador, y un plásmido que incluye

al ARNg. El proceso resultó en una alta eficiencia y especificidad, demostrando la utilidad de CRISPR/Cas para las modificaciones a nivel genoma.¹²

Estas modificaciones, al ser estables, se transmiten por la línea germinal y permiten la generación de modelos animales para futuras investigaciones. Estos experimentos se ha llevado a cabo con éxito también en modelos murinos.¹³

b. Deleción dentro del genoma

Gracias a la actividad endonucleasa de Cas, este mecanismo puede emplearse para generar deleciones de fragmentos grandes en ADN de doble cadena. Incluso, no parece haber una correlación aparente entre el tamaño del fragmento (de cientos a mil pares de bases) y la frecuencia de las deleciones.¹⁴ Una investigación en pez cebra demostró su capacidad para generar deleciones de hasta mil pares de bases, haciendo posible abarcar varios genes o, incluso, zonas no codificantes.¹⁵

c. Mutagénesis

En lo que concierne a mutagénesis, el uso del sistema CRISPR/Cas se ha empleado para la detección y

Cuadro I. Ejemplo de plásmidos con el sistema CRISPR disponibles en el mercado.

Plásmido	Tamaño	Características
pCas-Guide*	8 kb	Contiene el codón de optimización para la expresión de Cas9 Scaffold de RNA Lugar de inserción para la secuencia de interés con un sitio Promotor de tipo citomegalovirus (CMV) Ori
pCas-Guide-GFP*	9.6 kb	Contiene los mismos elementos esenciales que el plásmido pCas-Guide, pero además, es capaz de expresar una proteína de tipo GFP para detectar la expresión en la célula huésped
pLenti-Cas-Guide*	11 kb	Contiene los elementos básicos para la correcta expresión del sistema y un backbone de tipo lentivirus, lo que facilita la transfección por un vehículo de tipo viral
pT7-Cas9*	9 kb	Este plásmido se usa para realizar microinyecciones de ARNm o transfección de ARNm. Contiene una zona que expresa poliA en su estructura, además de los promotores de tipo CVM y el sistema CRISPR

*Fuente: OriGene. <http://www.origene.com/CRISPR-CAS9/>

generación de mutaciones específicas en diferentes modelos animales, tales como *D. melanogaster*. Se ha demostrado que mediante la inserción del ARNg para una o varias secuencias específicas, se logra inducir mutagénesis en genes objetivo hasta con una eficiencia del 88%.¹⁶

Así mismo, dicho sistema se ha utilizado para la evaluación de las funciones de diferentes genes en ciertas plantas de interés, como *Nicotiana tabacum*. Por medio de CRISPR/Cas, se introdujeron dos genes (*NtPDS* y *NtPDR6*) para obtener una mutación en el sitio de interés. La evaluación de la inserción genómica a nivel de protoplastos demostró, una vez que se presenta el ARNg, una modificación genética de 16.2 a 20.3%. La eficiencia mutagénica por medio de este sistema en la planta de tabaco ha sido de 81.8% para *NtPDS* y 87.5% para *NtPDR6*.¹⁷

Otras aplicaciones

a. CRISPR interferencia (CRISPRi) como activador o represor de la expresión génica

El sistema CRISPR/Cas proporciona una manera de sondear y manipular el genoma sin alterar la secuencia genética subyacente a través de diversos procesos. Uno de estos mecanismos es por medio del CRISPR interferencia (CRISPRi), nombrado así por su actividad de silenciamiento de genes en referencia al ARN de interferencia.¹⁸ Posteriormente, otros grupos reportaron la inactivación de Cas9 (dCas9) y el uso de los complejos Cas9/ARNcr fusionados con diferentes dominios efectores represores. Esto permitió que el sistema CRISPR-Cas pueda ser empleado también como activador o represor de la expresión génica.^{19,20}

Hasta la fecha, el uso de quimeras dCas9 se ha utilizado para activar, así como para reprimir, la expresión de genes y seguir la localización subnuclear de genes y secuencias de ADN. Aunque la mutante dCas9 es catalíticamente inactiva, un primer enfoque reveló que dCas9 por sí sola puede interrumpir la expresión de un gen, posiblemente por interferir con la maquinaria transcripcional.²¹ Este efecto puede reforzarse al añadirle dominios efectores que inhiben la expresión genética, como el dominio «*Kruppel-associated box*» (KRAB).²²

Estudios posteriores fusionaron diferentes dominios de activación de la transcripción, como los activadores de transcripción viral VP16 o el triplete VP48, a dCas9. Debido a su control en la replicación del virus, la regulación de VP16 se estudia como un posible blanco terapéutico para infecciones virales. Este es-

tudio demostró que, gracias a dCas9, las proteínas de fusión pueden activar tanto transgenes como genes endógenos.²³⁻²⁶

b. Genómica funcional

Como parte de los objetivos de la genómica funcional se encuentra el estudio de la función que tiene un gen dentro del organismo. La genética reversa plantea estudiar el fenotipo resultado de una alteración en un determinado gen para vislumbrar su función. Para ello, se requiere de herramientas sitio-específicas que sean capaces de generar deleciones en nuestro gen de interés. La inyección *in vivo* del sistema CRISPR/Cas al cerebro de un ratón adulto, empleando como vector un virus adenoasociado, logró generar cambios tanto a nivel bioquímico como genético y funcional. Este tratamiento demostró la habilidad del complejo para actuar *in vivo* sobre uno o más genes de manera simultánea.²⁷

Por otro lado, el sistema puede emplearse para generar monitores genéticos (*genetic screen*) y análisis transcriptómicos. Una librería de ARNg puede emplearse para inducir mutaciones en cultivos y, a través de monitoreo genético, evaluar la interacción de genes que generan un fenotipo deseado.²⁸ El complejo también puede llevar acoplado un inhibidor (CRISPRi) o un activador (CRISPRa), compilándolos en una biblioteca y aplicándolos en un cultivo. Se logra una eficiencia de entre 90-99% de transformación, con una expresión diferencial de mil veces.²⁹ Por ello, la adición de activadores o inhibidores es otro recurso que se encuentra disponible para estos monitoreos, que además, pueden emplearse para el estudio de vías metabólicas.²⁴

c. Generación de modelos animales

Uno de los beneficios del sistema CRISPR/Cas es su aplicación en modelos animales con el objetivo de evaluar su funcionamiento y respuesta de manera que se puedan desarrollar diferentes técnicas de diagnóstico molecular, o bien, directamente como terapia genómica. En el caso del modelo animal de ratón, se ha demostrado que el uso de este sistema es más rápido y eficaz en la modificación a nivel genético que otras técnicas, como las nucleasas de dedos de zinc y TALEN. Además, permite modificar más de un gen de interés por experimento.³⁰

Por su estabilidad, este sistema se ha utilizado para desarrollar modelos *knockout* y *knockin* de pez cebra para enfermedades neurodegenerativas, como

la degeneración lobular frontotemporal y la esclerosis lateral amiotrófica.³¹ El transporte del ARNg a células neuronales, epiteliales e inmunológicas del ratón se realiza empleando vectores virales como los adenovirales y lentivirus.³²

Otra de las aplicaciones importantes del sistema CRISPR/Cas en modelos animales es el arreglo cromosomal mediante la fusión de genes para terapias contra el cáncer. Se creó un modelo murino para cáncer de pulmón al lograr la expresión del oncogén de fusión *Eml4-Alk*, el cual se emplea como blanco terapéutico para este subtipo de cáncer.³³

Alternativas para incrementar la especificidad en CRISPR/Cas

A pesar de las posibles aplicaciones del sistema CRISPR/Cas como herramienta de edición del genoma, existen limitaciones en su uso. Una de las principales desventajas de este sistema es la aparición de altas tasas de mutaciones no puntuales y translocaciones cromosómicas no deseadas, asociadas con escisiones fuera del objetivo del ADN.³⁴

Actualmente, existen una serie de alternativas para mejorar la especificidad y evitar estas desventajas (*Cuadro II*). Entre las soluciones más frecuentes se encuentra el uso de Cas9 nickase.³⁵ Cas9 nickase genera una rotura de una sola cadena (SSB) en las cadenas opuestas del ADN diana. EL ADN de hebras simples se repara a través de la vía de alta-fidelidad de reparación de escisión de bases (BER). La finalidad de Cas9 nickase es imitar al proceso de DSB, pero sin la alta tasa de mutaciones desviadas del objetivo. Por ello, si existen cortes desviados del objetivo provocados por Cas9 nickase, éstos son reparados a través de BER. Cas9 D10A es la nickase más utilizada; su mutación consiste en convertir el décimo codón de Cas9 salvaje de GAT a CGT.³⁶

Considerando el sistema de reparación de alta fidelidad BER, se han realizado estudios con el uso de la estrategia de doble nickase: se emplean dos ARNg, los cuales dirigen la actividad de Cas9 nickase de una sola hebra a sitios cercanos para producir un corte de doble hebra efectivo. Es importante, también, escoger un ARNg apropiado, para extender de manera más efectiva el número de bases reconocidas específicamente en el sitio de diana.³⁷

Por ello, una segunda estrategia consiste en una buena selección de ARNg para un ADN específico. El criterio de selección se basa en las bajas tasas de escisión desviadas del objetivo. Algunos primeros estudios sugieren que sólo 12 bases en la secuencia

guía, de las 20 totales, son las más cercanas a la secuencia PAM y, por ende, son las que contribuyen a la especificidad del sistema CRISPR/Cas9.¹¹

Estudios más recientes han utilizado este criterio, así como una gran cantidad de datos experimentales, para modelar la probabilidad de escisión para sitios desviados de objetivos. El modelo toma en cuenta la ubicación, número y disposición de las posibles desviaciones o algunos otros desajustes a partir de seleccionar un ARNg.³⁸ Finalmente, el resultado se muestra con un sistema de puntuación para seleccionar el ARNg con la mínima probabilidad de desviación del objetivo. Estos análisis se hacen a través de plataformas en línea como: <http://crispr.mit.edu>.

Usos como herramienta para enfermedades degenerativas

El sistema CRISPR, al igual que TALEN y los dedos de zinc, tiene una gran cantidad de aplicaciones en la edición genómica. Es por ello que representa una gran promesa para las enfermedades degenerativas al producir mejores modelos celulares o de organismos completos, permitir el diseño de terapias génicas o auxiliar en la edición de células madre pluripotentes inducidas (iPSC, por sus siglas en inglés). Sin embargo, la tecnología de CRISPR debe disminuir su tasa de mutaciones fuera del objetivo para poder ser considerada por las entidades regulatorias (como la FDA) una alternativa de terapia viable.³⁹

a. Generación de modelos

Debido a las características de eficiencia y rapidez que presenta el sistema CRISPR, se han desarrollado modelos más cercanos a la patología. Tal es el caso de ratones usados como modelo para la ataxia de Friedreich por la edición en el gen de *Fxn*;⁴⁰ para la distrofia muscular en el gen *Dmd*;⁴¹ y para cáncer en los genes *Kras*, *p53* y *LKB1*.³⁹ Por otro lado, también se cuenta con modelos del pez cebra como modelo para la degeneración lobular y esclerosis lateral amiotrófica.³²

b. Terapia génica

Los diversos usos que se le han dado al sistema CRISPR/Cas han permitido vislumbrar su aplicación en terapias génicas. En líneas celulares de osteosarcoma, el silenciamiento estable de *Cdk11* con CRISPR/Cas aumentó la muerte celular, disminuyó la migración y redujo la invasión por células malignas.⁴²

Cuadro II. Listado de modificaciones para aumentar la especificidad del sistema CRISPR/Cas9.

Organismo/línea celular	Molécula modificada	Tipo de modificación	Beneficio de la modificación	Referencias
<i>Drosophila melanogaste</i>	Cas9 (mutación a RuvC y/o HNH)	Cas9 nickase (Cas9 ^{D10A} mutante)	Aumenta especificidad y evita mutaciones fuera del objetivo	Xingjie Ren et al, 2014
Cigotos de ratón BDF1/línea celular HEK 293FT/línea celular mESC/células HeLa	Cas9	Cas9 double nickase (Cas9 ^{D10A} mutante)	Reducir la actividad de mutaciones fuera del objetivo de 50-1,000 veces en líneas celulares Facilitar el <i>knockout</i> de genes en cigotos de ratón	F Ann Ran et al, 2013 Kai Li et al, 2014 Cho SW et al, 2014
Línea K562 y células HeLa	ARN guía	Añadir un nucleótido extra (guanina) en la dirección 5'/ usar ARN guía dual (ARNcr + tracrARN)/usar ARN guía sintético (no codificado por plásmido)	Efectos acumulativos en bajar la frecuencia de mutaciones desviadas del objetivo	Cho SW et al, 2014
Línea celular humana	Cas9	Mutante Cas9 inactivo (dCas9) y la fusión del dímero de nucleasa FOK1 (ARN-guía Fok1 nucleasa, RFNs)	Incrementar la especificidad (aún más que el sistema doble de Cas9 nickase)	SQ Tsa et al, 2014

En otros experimentos, se corrigieron el gen *Fah* para la tirosinemia⁴³ y el gen *Dmd* para la distrofia muscular de Duchenne.⁴⁴ En células madre intestinales de pacientes con fibrosis quística, la modificación del receptor de membrana CFTR permitió recuperar el fenotipo normal.⁴⁵ Estas evidencias confirman que CRISPR/Cas es un sistema viable y eficaz, aplicable en modelos de animales adultos, para el desarrollo de terapias génicas.

CRISPR/Cas como terapia para la distrofia muscular de Duchenne

La distrofia muscular de Duchenne, una enfermedad ligada al X, se basa en una mutación en el gen DMD

que codifica para la distrofina. Esta enfermedad afecta a uno de cada 3,500 niños en el mundo y se caracteriza por una pérdida en la función y atrofia progresiva de los músculos proximales y pseudohipertrofia de los músculos gastrocnemios debido a bajos niveles de distrofina, una proteína que da estabilidad y soporte al citoesqueleto y la fibra muscular. Una serie de deleciones en diversos exones causa un cambio en el marco de lectura del gen. Existe evidencia de que, en pacientes con deleciones entre los exones 45 y 55 del gen codificante, la proteína trunca sigue siendo funcional.

Recientemente, un grupo de investigación logró la edición del genoma con CRISPR/Cas, con la intención de corregir el gen DMD en pacientes con distrofia

muscular de Duchenne.⁴⁶ Se emplearon el sistema CRISPR proveniente de *Streptococcus pyogenes* y diversos ARNGs para localizar las mutaciones entre los codones 45 y 55. Para la secuencia PAM, se seleccionaron secuencias tipo *photospacers* complementarios para localizar los extremos 5' y 3' en los exones mencionados. Para realizar la corrección, se usó el sistema NHEJ para generar deleciones en los exones y cambiar el marco de lectura de manera análoga al mecanismo *exonskipping*.

Los resultados mostraron un aumento en los niveles de distrofina en un 60%. Esto representa un aumento significativo, sobre todo si se compara con otros sistemas anteriormente usados, como TALENs y dedos de zinc.⁴⁶ En el caso específico de la distrofia muscular de Duchenne, CRISPR representa una terapia factible debido a que genera ediciones de manera fácil y eficiente.

c. Terapia celular

Este complejo también ha sido empleado en terapia celular, con una eficiencia incluso mejor que TALEN.⁴⁷ El reemplazo celular, a través de modificaciones *ex vivo* de células para volver a introducirlas, crea una importante oportunidad de aplicaciones para CRISPR en la terapia. Esto se ha considerado para enfermedades neurodegenerativas como Huntington, Parkinson, Alzheimer y esclerosis lateral amiotrófica debido a la pérdida progresiva en el número de neuronas.⁴⁸

El uso de iPSC modificadas por recombinación homóloga con terapia viral ha sido probado exitosamente en modelos animales para las enfermedades de Parkinson y Huntington. Aunque este método es muy lento y la terapia viral es riesgosa, la tasa de mutaciones fuera del objetivo es muy baja.⁴¹

Como otra opción, la corrección en iPSC tiene el potencial de mejorar las terapias regenerativas.^{49,50} La corrección por recombinación homóloga del gen *dmd* en líneas germinales de ratones mdx (modelo de distrofia muscular) favoreció la regeneración muscular en las células modificadas.⁴⁸ Otro equipo logró la transformación exitosa de iPSC a partir de pacientes con distrofia muscular de Duchenne, reparando exitosamente el gen.⁵¹

CRISPR/Cas como terapia celular para enfermedad isquémica del corazón

La terapia de células madre es una alternativa prometedora a los trasplantes de corazón en pacientes con enfermedad isquémica del corazón (EIC), condición

que representó la principal causa de muerte en 2012 de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud.⁵² La EIC ocurre cuando la demanda de oxígeno del músculo cardíaco supera el suministro; es decir, un desbalance entre el flujo coronario y la demanda de oxígeno del miocardio. Dicho desequilibrio es causado por un bloqueo parcial o completo de las arterias (aterosclerosis).⁵³

Actualmente, la cardiomioplastia celular, terapia con células madre para regenerar el tejido cardíaco, presenta grandes ventajas al regenerar el miocardio y, por ende, reducir la pérdida de función cardíaca. Sin embargo, la baja tasa de supervivencia de células después de los injertos representa un gran problema para esta terapia.

De acuerdo con Liang Tand y colaboradores,⁵⁴ la transducción de un vector que sobreexpresa la vía de la hemooxigenasa 1 (HO-1) aumenta la viabilidad en células madre injertadas al miocardio, al reducir la muerte por apoptosis y protegerlas de la respuesta antiinflamatoria del cuerpo. Desafortunadamente, la sobreexpresión de esta vía sin la regulación apropiada tiene efectos citotóxicos. Por ello, A Pan y su grupo proponen el uso del sistema CRISPR/dCas9 para mejorar la supervivencia de las células madre injertadas al miocardio.

La propuesta consiste en usar distintos ARNG dirigidos a *loci* específicos en la secuencia promotora del gen de la HO-1. De esta manera, se identifica la secuencia que aumenta la expresión del gen endógeno, sin llegar a los niveles de citotoxicidad, al comparar la toxicidad de la variación en los niveles de HO-1. En este mismo estudio, se destaca la necesidad de usar el sistema CRISPR/dCas9 por sus altos niveles de especificidad y eficiencia.⁵⁵

Perspectivas a futuro

A pesar de los pocos años que tiene su descubrimiento, el sistema CRISPR/Cas se está posicionando como una herramienta confiable para regular o modificar genes. Cada vez es mayor el número de investigaciones donde se emplean las propiedades del sistema CRISPR/Cas como herramienta para la biología molecular. En 2014, surgió la primera patente de CRISPR/Cas para realizar ediciones sobre el genoma.⁵⁶ No sólo permite llevar a cabo ediciones rápidas y eficientes directamente a nivel genómico, sino que, además, puede trabajar con más de un gen a la vez. Por último, la complementariedad de los 20 pares de bases de ARNG permite hacer las modificaciones de manera sitio-específica. Lamentablemente, a pesar de

las ventajas que presenta este sistema para la edición de genomas, un exceso del complejo puede anclarse «*off-target*»; es decir, en secuencias diferentes al ADN blanco.⁵⁷ Para corregir este problema, se han empleado diversas estrategias para incrementar su especificidad. Sin embargo, el uso de estas estrategias tiene efecto negativo en la eficiencia, tanto en el sistema de nickase como en el uso de RFN.⁵⁸ El punto en donde la mayoría de los artículos coincide es el de elegir el mejor ARNg para lograr una menor tasa de mutaciones «*off-target*», lo que se consigue con apoyo de *software* basado en modelos de probabilidad.^{40,59}

Las propiedades del sistema CRISPR/Cas han permitido abrir la posibilidad de emplearlo para realizar terapia génica y celular. Se ha usado como herramienta para realizar mutaciones puntuales, recombinación homóloga por HDR, silenciamiento y activación o represión de la transcripción de genes. Gracias a estas propiedades, ha sido posible su aplicación para el monitoreo genético, análisis de rutas metabólicas, investigación de genómica funcional, generación de modelos animales, descubrimiento de posibles blancos para el tratamiento de enfermedades e, incluso, corrección de fenotipos.

Otra aplicación de gran importancia y que debe seguir desarrollándose es la generación de modelos animales más precisos y representativos para el estudio de enfermedades. Los modelos *knockdown*, *knockout* y *knockin* presentan la ventaja de poder generarse de manera rápida y eficiente con este sistema. Se prevé que en el futuro se generen un mayor número de ratones como modelo en diversas enfermedades debido al bajo costo, eficacia y facilidad de empleo de esta técnica.

Por último, al presentar tal variedad de mecanismos, consideramos que CRISPR/Cas puede ser una gran herramienta en el desarrollo de terapias biotecnológicas. Su capacidad para hacer correcciones a nivel genético, generar deleciones y regular la transcripción o traducción puede emplearse para abordar una serie de enfermedades a distintos niveles.

Bibliografía

1. Urnov FD, Rebar EJ, Holmes MC, Zhang HS, Gregory PD. Genome editing with engineered zinc finger nucleases. *Nat Rev Genet.* 2010; 11 (9): 636-646.
2. Christian M, Cermak T, Doyle EL, Schmidt C, Zhang F, Hummel A et al. Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. *Genetics.* 2010; 186 (2): 757-761.
3. Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M, Nakata A. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J Bacteriol.* 1987; 169 (12): 5429-5433.
4. Makarova KS, Grishin NV, Shabalina SA, Wolf YI, Koonin EV. A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action. *Biol Direct.* 2006; 1: 7.
5. Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science.* 2007; 315 (5819): 1709-1712.
6. Deltcheva E, Chylinski K, Sharma CM, Gonzales K, Chao Y, Pirzada ZA et al. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature.* 2011; 471 (7340): 602-607.
7. Jansen R, Embden JD, Gaastra W, Schouls LM. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Mol Microbiol.* 2002; 43 (6): 1565-1575.
8. Chylinski K, Le Rhun A, Charpentier E. The tracrRNA and Cas9 families of type II CRISPR-Cas immunity systems. *RNA Biol.* 2013; 10 (5): 726-737.
9. Garneau JE, Dupuis MÈ, Villion M, Romero DA, Barrangou R, Boyaval P et al. The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature.* 2010; 468 (7320): 67-71.
10. Sapranaukas R, Gasiunas G, Fremaux C, Barrangou R, Horvath P, Siksnys V. The *Streptococcus thermophilus* CRISPR/Cas system provides immunity in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* 2011; 39 (21): 9275-9282.
11. Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science.* 2013; 339 (6121): 819-823.
12. Gratz SJ, Ukken FP, Rubinstein CD, Thiede G, Donohue LK, Cummings AM et al. Highly specific and efficient CRISPR/Cas9-catalyzed homology-directed repair in *Drosophila*. *Genetics.* 2014; 196 (4): 961-971.
13. Gratz SJ, Cummings AM, Nguyen JN, Hamm DC, Donohue LK, Harrison MM et al. Genome engineering of *Drosophila* with the CRISPR RNA-guided Cas9 nuclease. *Genetics.* 2013; 194 (4): 1029-1035.
14. He Z, Proudfoot C, Mileham AJ, McLaren DG, Whitelaw CB, Lillico SG. Highly efficient targeted chromosome deletions using CRISPR/Cas9. *Biotechnol Bioeng.* 2015; 112 (5): 1060-1064.
15. Xiao A, Wang Z, Hu Y, Wu Y, Luo Z, Yang Z et al. Chromosomal deletions and inversions mediated by TALENs and CRISPR/Cas in zebrafish. *Nucleic Acids Res.* 2013; 41 (14): e141.
16. Bassett AR, Tibbit C, Ponting CP, Liu JL. Highly efficient targeted mutagenesis of *Drosophila* with the CRISPR/Cas9 system. *Cell Rep.* 2013; 4 (1): 220-228.
17. Gao J, Wang G, Ma S, Xie X, Wu X, Zhang X et al. CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis in *Nicotiana tabacum*. *Plant Mol Biol.* 2015; 87 (1-2): 99-110.
18. Richter H, Randau L, Plagens A. Exploiting CRISPR/Cas: interference mechanisms and applications. *Int J Mol Sci.* 2013; 14 (7): 14518-14531.
19. Makarova KS, Haft DH, Barrangou R, Brouns SJ, Charpentier E, Horvath P et al. Evolution and classification of

- the CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol.* 2011; 9 (6): 467-77.
20. Sander JD, Joung JK. CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nat Biotechnol.* 2014; 32 (4): 347-355.
 21. Harrison MM, Jenkins BV, O'Connor-Giles KM, Wildonger J. A CRISPR view of development. *Genes Dev.* 2014; 28 (17): 1859-1872.
 22. Gilbert LA, Larson MH, Morsut L, Liu Z, Brar GA, Torres SE et al. CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes. *Cell.* 2013; 154 (2): 442-451.
 23. Bikard D, Jiang W, Samai P, Hochschild A, Zhang F, Marraffini LA. Programmable repression and activation of bacterial gene expression using an engineered CRISPR-Cas system. *Nucleic Acids Res.* 2013; 41 (15): 7429-7437.
 24. Maeder ML, Linder SJ, Cascio VM, Fu Y, Ho QH, Joung JK. CRISPR RNA-guided activation of endogenous human genes. *Nat Methods.* 2013; 10 (10): 977-979.
 25. Perez-Pinera P, Kocak DD, Vockley CM, Adler AF, Kabadi AM, Polstein LR et al. RNA-guided gene activation by CRISPR-Cas9-based transcription factors. *Nat Methods.* 2013; 10 (10): 973-976.
 26. Kearns NA, Genga RM, Enuameh MS, Garber M, Wolfe SA, Maehr R. Cas9 effector-mediated regulation of transcription and differentiation in human pluripotent stem cells. *Development.* 2014; 141 (1): 219-223.
 27. Swiech L, Heidenreich M, Banerjee A, Habib N, Li Y, Trombetta J et al. *In vivo* interrogation of gene function in the mammalian brain using CRISPR-Cas9. *Nat Biotechnol.* 2015; 33 (1): 102-106.
 28. Wang T, Wei JJ, Sabatini DM, Lander ES. Genetic screens in human cells using the CRISPR-Cas9 system. *Science.* 2014; 343 (6166): 80-84.
 29. Gilbert LA, Horlbeck MA, Adamson B, Villalta JE, Chen Y, Whitehead EH et al. Genome-scale CRISPR-mediated control of gene repression and activation. *Cell.* 2014; 159 (3): 647-661.
 30. Harms DW, Quadros RM, Seruggia D, Ohtsuka M, Takahashi G, Montoliu L et al. Mouse genome editing using the CRISPR/Cas system. *Curr Protoc Hum Genet.* 2014; 83: 15.7.1-27.
 31. Schmid B, Haass C. Genomic editing opens new avenues for zebrafish as a model for neurodegeneration. *J Neurochem.* 2013; 127 (4): 461-470.
 32. Platt RJ, Chen S, Zhou Y, Yim MJ, Swiech L, Kempton HR et al. CRISPR-Cas9 knockin mice for genome editing and cancer modeling. *Cell.* 2014; 159 (2): 440-455.
 33. Maddalo D, Machado E, Concepcion CP, Bonetti C, Vidigal JA, Han YC et al. *In vivo* engineering of oncogenic chromosomal rearrangements with the CRISPR/Cas9 system. *Nature.* 2014; 516 (7531): 423-427.
 34. Cho SW, Kim S, Kim Y, Kweon J, Kim HS, Bae S et al. Analysis of off-target effects of CRISPR/Cas-derived RNA-guided endonucleases and nickases. *Genome Res.* 2014; 24 (1): 132-141.
 35. Hsu PD, Lander ES, Zhang F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell.* 2014; 157 (6): 1262-1278.
 36. Ren X, Yang Z, Xu J, Sun J, Mao D, Hu Y et al. Enhanced specificity and efficiency of the CRISPR/Cas9 system with optimized sgRNA parameters in *Drosophila*. *Cell Rep.* 2014; 9 (3): 1151-1162.
 37. Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc.* 2013; 8 (11): 2281-2308.
 38. Zhu LJ, Holmes BR, Aronin N, Brodsky MH. CRISPRseek: a bioconductor package to identify target-specific guide RNAs for CRISPR-Cas9 genome-editing systems. *PLoS One.* 2014; 9 (9): e108424.
 39. Li M, Suzuki K, Kim NY, Liu GH, Izpisua Belmonte JC. A cut above the rest: targeted genome editing technologies in human pluripotent stem cells. *J Biol Chem.* 2014; 289 (8): 4594-4599.
 40. The Jackson Laboratory. Alleles produced for the KOMP project by The Jackson Laboratory. MGI Direct Data Submission. 2012.
 41. Nakamura K, Fujii W, Tsuboi M, Tanihata J, Teramoto N, Takeuchi S et al. Generation of muscular dystrophy model rats with a CRISPR/Cas system. *Sci Rep.* 2014; 4: 5635.
 42. Feng Y, Sassi S, Shen JK, Yang X, Gao Y, Osaka E et al. Targeting CDK11 in osteosarcoma cells using the CRISPR-Cas9 system. *J Orthop Res.* 2015; 33 (2): 199-207.
 43. Yin H, Xue W, Chen S, Bogorad RL, Benedetti E, Grompe M et al. Genome editing with Cas9 in adult mice corrects a disease mutation and phenotype. *Nat Biotechnol.* 2014; 32 (6): 551-553.
 44. Long C, McAnally JR, Shelton JM, Mireault AA, Bassel-Duby R, Olson EN. Prevention of muscular dystrophy in mice by CRISPR/Cas9-mediated editing of germline DNA. *Science.* 2014; 345 (6201): 1184-1188.
 45. Schwank G, Koo BK, Sasselli V, Dekkers JF, Heo I, Demircan T et al. Functional repair of CFTR by CRISPR/Cas9 in intestinal stem cell organoids of cystic fibrosis patients. *Cell Stem Cell.* 2013; 13 (6): 653-658.
 46. Ousterout DG, Kabadi AM, Thakore PI, Majoros WH, Reddy TE, Gersbach CA. Multiplex CRISPR/Cas9-based genome editing for correction of dystrophin mutations that cause Duchenne muscular dystrophy. *Nat Commun.* 2015; 6: 6244.
 47. Ding Q, Regan SN, Xia Y, Oostrom LA, Cowan CA, Musunuru K. Enhanced efficiency of human pluripotent stem cell genome editing through replacing TALENs with CRISPRs. *Cell Stem Cell.* 2013; 12 (4): 393-394.
 48. Jung YW, Hysolli E, Kim KY, Tanaka Y, Park IH. Human induced pluripotent stem cells and neurodegenerative disease: prospects for novel therapies. *Curr Opin Neurol.* 2012; 25 (2): 125-130.
 49. Xie F, Ye L, Chang JC, Beyer AI, Wang J, Muench MO et al. Seamless gene correction of β -thalassemia mutations in patient-specific iPSCs using CRISPR/Cas9 and piggyBac. *Genome Res.* 2014; 24 (9): 1526-1533.
 50. Hou Z, Zhang Y, Propson NE, Howden SE, Chu LF, Sontheimer EJ et al. Efficient genome engineering in human pluripotent stem cells using Cas9 from *Neisseria meningitidis*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013; 110 (39): 15644-15649.

51. Li HL, Fujimoto N, Sasakawa N, Shirai S, Ohkame T, Sakuma T et al. Precise correction of the dystrophin gene in Duchenne muscular dystrophy patient induced pluripotent stem cells by TALEN and CRISPR-Cas9. *Stem Cell Reports*. 2015; 4 (1): 143-154.
52. Organización Mundial de la Salud. Estadísticas Sanitarias Mundiales 2014: Una mina de información sobre salud pública mundial. 2014.
53. Moreu-Burgosa J, Macaya-Miguel C. Fisiopatología del miocardio isquémico. Importancia de la frecuencia cardíaca. *Rev Esp Cardiol Supl*. 2007; 7 (D):19-25.
54. Tang YL, Tang Y, Zhang YC, Qian K, Shen L, Phillips MI. Improved graft mesenchymal stem cell survival in ischemic heart with a hypoxia-regulated heme oxygenase-1 vector. *J Am Coll Cardiol*. 2005; 46 (7): 1339-1350.
55. Pan A, Weintraub NL, Tang Y. Enhancing stem cell survival in an ischemic heart by CRISPR-dCas9-based gene regulation. *Med Hypotheses*. 2014; 83 (6): 702-705.
56. Sheridan C. First CRISPR-Cas patent opens race to stake out intellectual property. *Nat Biotechnol*. 2014; 32 (7): 599-601.
57. Pattanayak V, Lin S, Guilinger JP, Ma E, Doudna JA, Liu DR. High-throughput profiling of off-target DNA cleavage reveals RNA-programmed Cas9 nuclease specificity. *Nat Biotechnol*. 2013; 31 (9): 839-843.
58. Tsai SQ, Wyvekens N, Khayter C, Foden JA, Thapar V, Reyon D et al. Dimeric CRISPR RNA-guided FokI nucleases for highly specific genome editing. *Nat Biotechnol*. 2014; 32 (6): 569-576.
59. Li K, Wang G, Andersen T, Zhou P, Pu WT. Optimization of genome engineering approaches with the CRISPR/Cas9 system. *PLoS One*. 2014; 9 (8): e105779.