

EDICIÓN DE GENOMAS POR CRISPR EN INVESTIGACIÓN BÁSICA Y APLICADA

Marcos Palavecino^{1,2} & Manuel de la Mata^{*1,2}

¹ Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (FCEyN-UBA), Ciudad Autónoma de Buenos Aires, República Argentina.

² Universidad de Buenos Aires - Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Instituto de Fisiología, Biología Molecular y Neurociencias (IFIBYNE-CONICET), Ciudad Autónoma de Buenos Aires, República Argentina.

* Autor a quien dirigir la correspondencia. e-mail: mmata@fbmc.fcen.uba.ar

INDICE

RESUMEN	9
SUMMARY	10
CRISPR genome editing in basic and applied research	10
Edición de genomas - los comienzos	10
Edición de genomas - siglo XX	10
2000s. Era genómica	11
¿Por qué y para qué editar genomas?	12
Edición de genomas – siglo XXI	13
Origen de CRISPR en procariontes	15
Adaptación de CRISPR como herramienta genética	17
Aplicación de CRISPR en <i>screenings</i> genéticos	19
Regulación de genomas por CRISPR	20
Edición de ARN por CRISPR	22
Limitaciones y mejoras de los sistemas CRISPR	24
Aplicaciones de CRISPR con fines terapéuticos	26
Aplicaciones (controvertidas) de CRISPR	28
Conclusiones, desafíos pendientes y perspectivas futuras	30
AGRADECIMIENTOS	30
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31

RESUMEN

La tecnología CRISPR ha revolucionado nuestra capacidad de manipular genomas en diversos organismos. Su relativa simplicidad y bajo costo han permitido una gran masividad en su aplicación, "democratizando" la edición de genomas y haciéndola accesible esencialmente a cualquier laboratorio pequeño de biología molecular. En este artículo se resumen el origen y las bases moleculares de la edición de genomas en general y de la tecnología CRISPR particular, las aplicaciones que ha permitido en la práctica y lo que potencialmente permitirá en un futuro próximo, funcionando como catalizador de investigaciones básicas en genética, medicina molecular y biotecnología.

Palabras clave: CRISPR/Cas, *screening*, nucleasas

SUMMARY

CRISPR GENOME EDITING IN BASIC AND APPLIED RESEARCH

CRISPR technology has revolutionized our ability to manipulate genomes in a diversity of organisms. Its relative simplicity and low cost have led to its massive application, democratizing genome editing and making it accessible to essentially any small-sized molecular biology laboratory. Here we review the origin and molecular basis of genome editing in general and of CRISPR technology in particular, discussing the applications it made possible in practice and that it will potentially allow in the near future, working as a catalyst of basic research in genetics, molecular medicine and biotechnology.

Keywords: CRISPR/Cas, screening, nucleases.

EDICIÓN DE GENOMAS - LOS COMIENZOS

A pesar de su reciente popularización debido a los grandes avances del campo en relación a la tecnología CRISPR, la modificación genética de animales y plantas, por parte del ser humano, no es una novedad y de hecho ha ocurrido tempranamente a lo largo de su historia. Desde los comienzos de la agricultura y la ganadería hace más de 10 mil años, se seleccionaron y domesticaron diversas especies de interés, lo que significó el comienzo de la modificación tanto de la flora y la fauna como del medio ambiente. Este proceso de selección y modificación permitió a la humanidad obtener nuevos materiales y alimentos, inclusive seleccionar especies con fines puramente estéticos. Las modificaciones genéticas introducidas por el hombre dieron lugar a profundos cambios sociales, económicos y políticos, por ejemplo, el desarrollo de la agricultura, la aparición de nuevos cultivares, el desarrollo y mejoramiento de nuevas técnicas agronómicas.

El método de observación y selección de fenotipos de interés utilizado históricamente fue en esencia el mismo que utilizó Gregor Mendel en los experimentos que lo llevarían a postular sus leyes de la herencia entre 1865 y 1866. Estos postulados sentaron las bases de la genética clásica y de su método, **la genética directa** (*forward genetics*), el cual consiste esencialmente en seleccionar individuos cuyo fenotipo es llamativo (generalmente mutantes naturales o inducidos por agentes mutagénicos como compuestos químicos o radiación ionizante) en relación a individuos control y, en última instancia, poder identificar el gen o los genes (genotipo) responsable/s de dicho fenotipo (Griffiths *et al.*, 2012).

EDICIÓN DE GENOMAS - SIGLO XX

Luego de los míticos experimentos realizados entre 1928 y 1952 que demostraron que la información genética se encuentra bajo la forma de ácido desoxirribonucleico (ADN) (y no en forma de proteínas como se pensaba hasta ese momento) (Griffith, 1928; Avery *et al.*, 1944; Hershey & Chase, 1952), y gracias a los resultados cristalográficos de Rosalind Franklin (Franklin & Gosling, 1953), fue posible que James Watson y Francis Crick describiesen la estructura de doble hélice y el apareamiento de bases del ADN (Watson & Crick, 1953). Estos descubrimientos representaron los cimientos para conocer en detalle la estructura y función del ADN y permitió el surgimiento de la **genética reversa**. Esta última parte del conocimiento de la secuencia de ADN de genes putativos, emplea herramientas de genética molecular y de transgénesis para generar mutantes que modifiquen o lleven a la pérdida de función de dichos genes y, que en última instancia, permitan

dilucidar su función normal. De esta manera, mientras que la genética directa parte de manipular o seleccionar fenotipos para llegar a conocer los genotipos asociados, la genética reversa parte de manipular o modificar distintos genotipos para llegar a conocer los fenotipos asociados a ellos. Y fue, en última instancia, la genética reversa la que dio origen a las formas modernas de la edición de genomas.

La transgénesis, o el proceso de transferir genes de un organismo a otro, fue el primer ejemplo de edición de genomas moderno. En 1962 se realizó la primera transferencia de genes heredables en células de mamífero (gen HGPRT – síntesis de purinas) (Szybalska & Szybalski, 1962). Pero a pesar de su utilidad, la transgénesis se limitó a la introducción de genes o secuencias de ADN que se insertan al azar en uno a varios sitios del genoma de células receptoras, sin permitir la modificación de los genes endógenos de manera sitio-específica (Fig. 1A). En 1979 se describió el primer sistema para poder introducir o eliminar secuencias específicas de ADN en el genoma (en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*) basado en aprovechar la maquinaria endógena de recombinación homóloga (mecanismo natural que las células utilizan para reparar el ADN dañado o cortado, en una o las dos hebras del ADN, a causa de la radiación, agentes mutagénicos, entre otros) (Scherer & Davis, 1979) (Fig. 1B). En los años de 1980, el mismo principio fue utilizado en las células de los mamíferos para generar ratones con modificaciones específicas en genes de interés (tecnología *knockin/knockout*) que les valió a Mario Capecchi, Martin Evans y Oliver Smithies el premio Nobel en medicina o fisiología en 2007 (Nobelprize.org 2007). Esta tecnología posibilitó, entre otras cosas, la generación de modelos animales de enfermedades humanas (Thomas *et al.*, 1986; Smithies *et al.*, 1985; Kuehn *et al.*, 1987).

2000s. ERA GENÓMICA

Los estudios sobre la naturaleza de los genes y el desarrollo de las técnicas de secuenciación del ADN eventualmente llevaron a la secuenciación de genomas de distintos organismos. Tan solo a través de métodos clásicos de secuenciación (método de Sanger) fue posible obtener las primeras secuencias de genomas completos de fagos, bacterias, virus, hongos y levaduras, hasta obtenerse el primer borrador del genoma humano en el año 2001 (Sanger *et al.*, 1977; Lander *et al.*, 2001). Si bien los primeros métodos de secuenciación eran costosos y consumían tiempo, los avances tecnológicos han llevado no sólo a reducir los

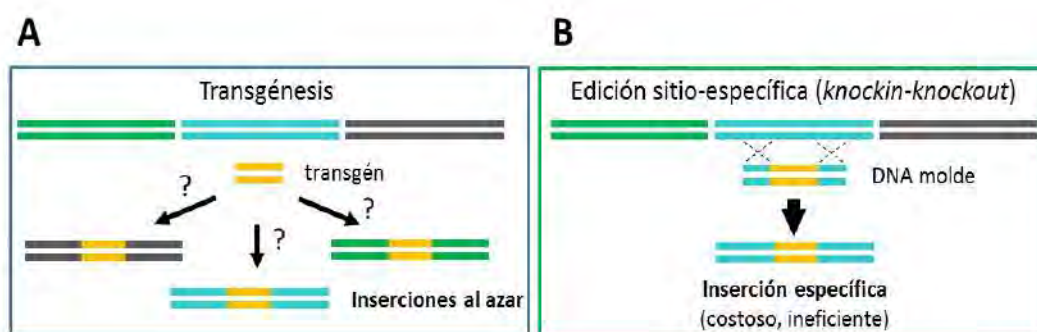


Figura 1. Edición clásica de genomas por: (A) transgénesis al azar o (B) edición sitio-específica (*knockin-knockout*).

costos de secuenciación, sino también su eficiencia y el tiempo necesario para hacerlo. Los métodos actuales de secuenciación masiva (NGS, del inglés next generation sequencing) permiten secuenciar genomas completos con muy alto rendimiento (por ejemplo, un secuenciador actual como el NextSeq 2000 de Illumina permite obtener las secuencias del genoma humano completo de hasta 50 individuos en menos de dos días en una única corrida del instrumento). Actualmente se encuentran disponibles distintas tecnologías de secuenciación masiva, las cuales difieren en los métodos de detección, el equipamiento usado y en el costo (Giani et al., 2020). La consecuencia de la progresiva y continua mejora en los métodos de secuenciación está llevando a una enorme acumulación de datos de secuencias de genomas humanos y de distintos organismos modelo (y de anotaciones sobre las secuencias, es decir, de indicaciones sobre qué secuencias corresponden a cuáles potenciales genes, promotores u otras secuencias de interés). En definitiva, estas tecnologías nos están entregando una enorme lista de potenciales genes de interés sobre los cuales sería posible realizar manipulaciones a través de técnicas de edición de genomas, a fines de entender mecanismos moleculares, mejorar especies vegetales o animales y eventualmente curar enfermedades genéticas.

¿POR QUÉ Y PARA QUÉ EDITAR GENOMAS?

Como se describe en las secciones siguientes, las técnicas de edición de genomas, en particular gracias a los desarrollos de la tecnología CRISPR, se encuentran en un nivel de desarrollo que permiten manipulaciones genéticas antes impensadas. Sumando a esto, las mejoras introducidas a los métodos de secuenciación y la caída en los tiempos y costos de la secuenciación, están permitiendo que rápidamente se obtenga la secuencia de genomas no solo de distintas especies, sino de cientos de miles de individuos de cada especie, tanto sanos como portadores de enfermedades genéticas. Gracias a estos datos sabemos que algunas diferencias genéticas entre individuos son **perjudiciales**. En este sentido se ha podido comprender que más de 4000 genes se encuentran asociados con desórdenes genéticos en humanos (<https://www.omim.org/statistics/geneMap>),

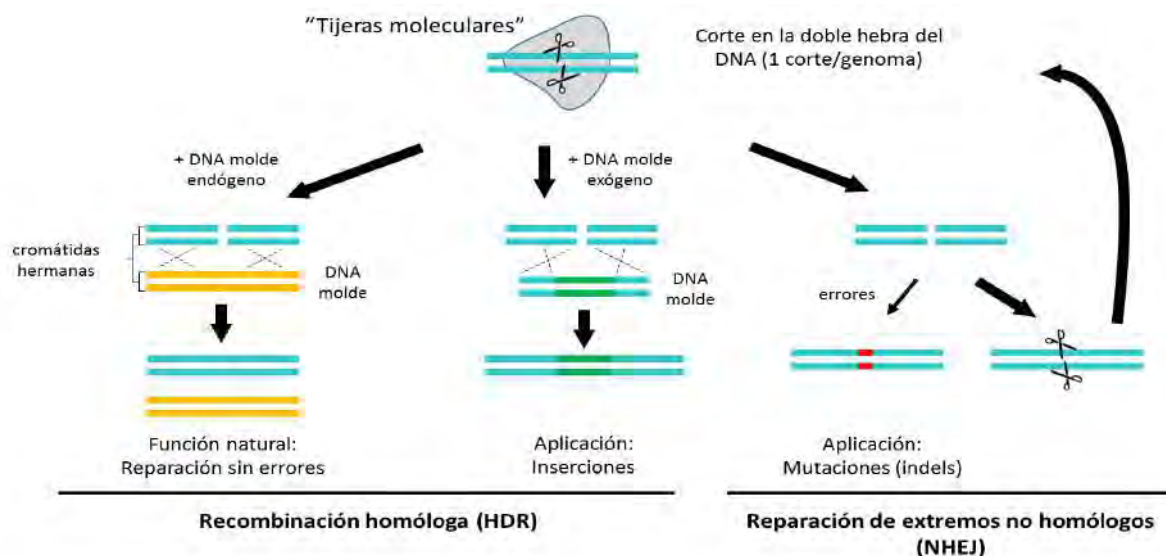


Figura 2. Mecanismos celulares de reparación del DNA que permiten la edición de genomas mediada por cortes en la doble hebra de DNA.

lo cual es de relevancia para la salud pública y la industria farmacéutica. Por ejemplo, la anemia falciforme, la fibrosis quística, distrofia muscular de Duchenne son enfermedades causadas por diferencias genéticas conocidas, muchas de las cuales son potencialmente curables a través de terapias génicas que utilizan métodos de edición de genomas (Rodino-Klapac *et al.*, 2007; Schwank *et al.*, 2013; Long *et al.*, 2014; Dever *et al.*, 2016). Por otro lado, algunas diferencias genéticas entre individuos son **potencialmente ventajosas**. Por ejemplo, ciertas variantes en el gen CCR5 (natural en el 10 % de los europeos) protegen con la infección a HIV (de Silva & Stumpf, 2004), ciertas variantes de ApoE reducen el riesgo de Alzheimer (Sadigh-Eteghad *et al.*, 2012) y mutaciones en el gen SLC30A8 (ZnT8) reducen en un 65% el riesgo de contraer diabetes tipo 2 diabetes (T2D) (Flannick *et al.*, 2014). Sin embargo, a pesar del enorme potencial que ofrece la edición de genomas tanto con fines de curar como de prevenir enfermedades específicas, existen serias consideraciones éticas con respecto a conducir este tipo de modificaciones genéticas (Caplan *et al.*, 2015), en particular cuando puede tratarse de modificaciones heredables. De hecho, el conocimiento y las aplicaciones ya existentes que permitirían utilizar la edición génica en células humanas para introducir “mejoras” genéticas (Xu *et al.*, 2017), han librado vastas controversias éticas acerca de su aplicación en células germinales humanas (Dzau *et al.*, 2019; Lander *et al.*, 2019; Wolinetz & Collins, 2019).

EDICIÓN DE GENOMAS – SIGLO XXI

Si bien la tecnología de edición sitio-específica basada en recombinación homóloga –como la tecnología *knockin/knockout*- permitió una muy alta especificidad en la mutación o modificación de genes, su eficiencia resultó muy baja (Fig. 1B). Con la llegada de la tecnología de silenciamiento de genes por ARN de interferencia (RNAi) los investigadores tuvieron acceso a una alternativa rápida, de bajo costo y de alto rendimiento con respecto a la recombinación homóloga sitio-específica (McManus & Sharp, 2002). Sin embargo, el silenciamiento por RNAi resultó ser frecuentemente incompleto y variable entre experimentos y laboratorios, poseer efectos inespecíficos (*off-target*) difíciles de predecir y producir solo una inhibición temporaria de la expresión de genes. Esto les ha impedido a los investigadores conectar fenotipos con genotipos y ha limitado en la práctica la aplicación de la tecnología de RNAi.

En la actualidad, la edición de genomas moderna ha conseguido aumentar en órdenes de magnitud su eficacia con respecto a la tecnología de edición sitio-específica convencional (*knockin/knockout*) a través de inducir cortes específicos en las dos hebras del ADN en regiones del genoma que se desea editar (Fig. 2). La razón por la cual, el inducir cortes en el ADN resulta tan eficiente para la ingeniería de genomas reside en que las células, tanto de plantas como animales, tienen la capacidad de detectar dichos cortes y repararlos. Y es durante la reparación del ADN, en respuesta al corte, que los métodos modernos de edición de genomas actúan para introducir las modificaciones deseadas.

La reparación del ADN puede llevarse a cabo de dos mecanismos diferentes: reparación de extremos no homólogos (NHEJ (*non homologous end joining*)); o por recombinación homóloga (*homology-directed repair*, HDR). En los mamíferos, el mecanismo que predomina es el de NHEJ, mientras que HDR se utiliza solamente durante un corto tiempo después de la replicación del ADN (en las fases S y G2), y es esencial en células que se encuentran dividiéndose y en la meiosis, cuando las cromátidas hermanas se encuentran disponibles como moldes. La reparación por HDR, al ser guiada por un molde, es casi perfecta y sin errores. De este modo, si al mismo tiempo que se produce el corte en el genoma se introduce en la célula un ADN molde exógeno (artificial), pueden lograrse inserciones específicas como reemplazar un determinado codón codificante por

otro, adosar una proteína fluorescente (exógena) a una proteína de interés (endógena), entre otras (Fig. 2, izquierda). Por otro lado, la reparación por NHEJ, que es el principal mecanismo que opera cuando no se introduce un molde, tiene menor fidelidad y una mayor tasa de errores que la reparación mediada por HDR. Los errores más frecuentes introducidos por NHEJ son pequeñas inserciones o eliminaciones (indels, del inglés insertions-deletions) de 1-2 pares de nucleótidos (Fig. 2, derecha). Los investigadores pueden aprovecharse de la reparación “imperfecta” que lleva a cabo el NHEJ para introducir mutaciones en regiones codificantes de genes de interés que llevan a la pérdida de la función de las proteínas codificadas: como los indels de 1-2 pares de nucleótidos cambian el marco de lectura de los ARNs mensajeros (mRNAs), estos generalmente conducen a la incorporación de codones STOP de la traducción prematuros, llevando a la síntesis de proteínas truncas no funcionales y frecuentemente a la degradación de los mRNAs por el mecanismo de NMD (nonsense-mediated decay) (Baker & Parker, 2004).

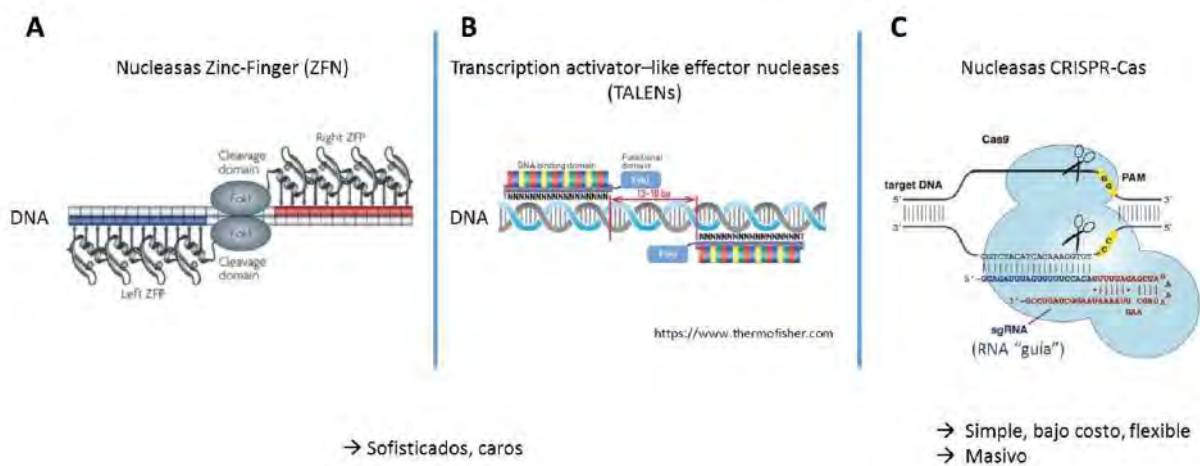


Figura 3. Nucleasas utilizadas en la edición de genomas. (A) Nucleasas *Zinc-Finger* (ZFN). Extraído de Urnov *et al.* (2010). (B) Transcription activator–like effector nucleases (TALENs). Extraído de <http://bit.ly/3bBraas>. (C) Nucleasas CRISPR-Cas. Extraído de Jinek *et al.* (2012).

La primera década del siglo XXI marcó el comienzo de la edición de genomas moderna, desarrollándose distintas nucleasas “de diseño” con el fin de inducir cortes en ambas hebras del ADN en sitios de interés. Comúnmente se las conoce como “tijeras moleculares” y pueden diseñarse contra secuencias de ADN específicas (Fig. 3). Se trata, en definitiva, de enzimas de restricción artificiales con actividad endonucleolítica capaces de cortar secuencias de ADN contra las cuales están dirigidas (secuencias blanco). Una característica común a todas estas nucleasas es que pueden ser diseñadas para reconocer y cortar secuencias de aproximadamente 20-22 nucleótidos, lo que resulta en una frecuencia teórica del orden de 1 corte cada 10^{12} pares de bases (bp). Si se toma como referencia el tamaño del genoma humano ($3,2 \times 10^9$ bp), la probabilidad teórica de que una nucleasa específica corte inespecíficamente (e indeseadamente) por azar al genoma es extremadamente baja ($< 1\%$), lo cual hace posible la obtención de un **corte único** en todo el genoma y una edición específica de interés.

Las primeras nucleasas desarrolladas fueron las nucleasas con dedos de Cinc (ZFN, *zinc finger nucleases*) que son construcciones quiméricas compuestas de dos dominios, un dominio de unión al ADN y un dominio catalítico con la capacidad de cortar el ADN (Fig. 3A). El dominio de unión al ADN consiste en varios módulos de dedos de Cinc, cada uno de los cuales reconoce 3 pares de bases del ADN y que en conjunto permiten reconocer secuencias de 9-18 pares de bases. Como dominio para cortar el ADN típicamente se

utiliza el dominio de la endonucleasa FokI, el cual debe dimerizar para estar activo. Por este motivo, las nucleasas *Zinc-Finger* se diseñan de a pares, de modo que el dominio *FokI* se dimerice y así adquiera la actividad catalítica de cortar ADN. Al valerse de dos eventos de unión al ADN, las nucleasas *Zinc-Finger* poseen una alta especificidad en generar un único corte en todo el genoma (Fig. 3A) (Urnov *et al.*, 2010).

Las nucleasas TALEN (*transcription activator-like effector nucleases*), contemporáneas a las nucleasas *Zinc-Finger*, son conceptualmente similares a estas últimas, con la diferencia de que las primeras contienen sucesiones de dominios TALE (*Transcription activator-like effectors*) de unión al ADN, cada uno con la

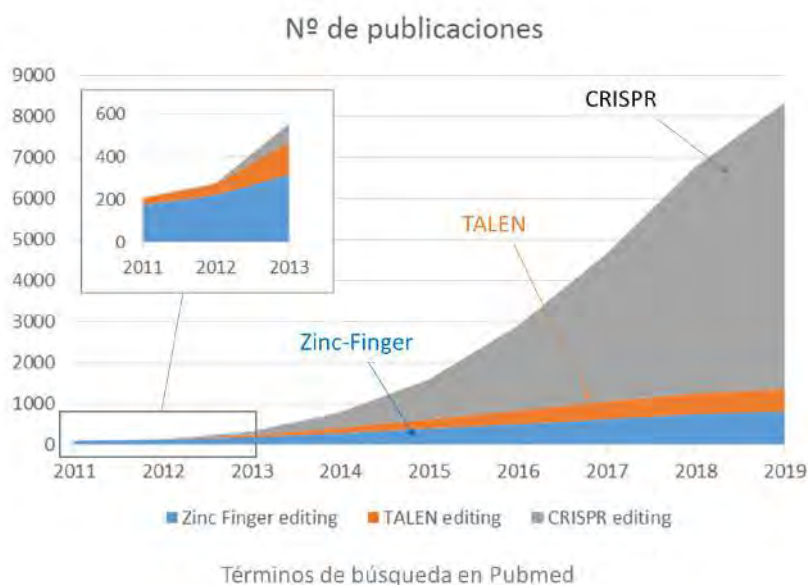


Figura 4. Progresión del número de publicaciones utilizando CRISPR vs. Zinc-Fingers y TALENs.

capacidad de reconocer bases únicas en la secuencia de ADN blanco (Fig. 3B) (Gaj *et al.*, 2013). Si bien ambas metodologías de edición son específicas y eficientes para editar genomas, resultaron ser extremadamente sofisticadas y caras de sintetizar, lo cual ha llevado a que sean paulatinamente dejadas de lado. Esto también en parte responde al surgimiento de la tecnología CRISPR.

Las nucleasas CRISPR/Cas consisten en complejos ribonucleoproteicos (RNPs) de tan solo dos componentes: una proteína Cas (la más popular es Cas9), con la capacidad de cortar la doble hebra del ADN, y una molécula de ARN pequeño (sgRNA) que guía a la proteína Cas hacia su secuencia blanco (Fig. 3C) (Doudna & Charpentier, 2014, Chen & Doudna, 2017). Desde su surgimiento, la tecnología CRISPR ha resultado ser extremadamente efectiva, de bajo costo, simple y flexible, lo cual devino en su uso masivo como el método de preferencia para realizar modificaciones en el genoma de una infinidad de organismos modelo. Esto se ve reflejado en la progresión de las publicaciones que emplean las distintas nucleasas aquí descritas (Fig. 4), lo que da cuenta de la extraordinaria explosión en la utilización de las herramientas basadas en CRISPR para la edición de genomas en investigación tanto básica como aplicada.

ORIGEN DE CRISPR EN PROCARIOTAS

CRISPR (acrónimo de *clustered regulatory interspaced short palindromic repeats*) está presente en procariotas (bacterias y arqueas) y actúa naturalmente como un mecanismo de inmunidad adaptativa

contra patógenos. A diferencia de los mecanismos de inmunidad innata procariontes que confieren una defensa generalizada contra diversos invasores como fagos y plásmidos (enmascaramiento de receptores de membrana, modificación por restricción R-M, ARN de interferencia y exclusión de bacteriófagos BREX/PGL), la inmunidad CRISPR funciona de manera análoga a la inmunidad adaptativa en vertebrados, generando una memoria contra infecciones previas que permite responder de manera rápida y robusta frente a las infecciones recurrentes. De hecho CRISPR cambió el paradigma según el cual la inmunidad adaptativa, es decir aquella capaz de reconocer y recordar nuevos patógenos específicos, es exclusiva de animales (Mohanraju *et al.*, 2016).

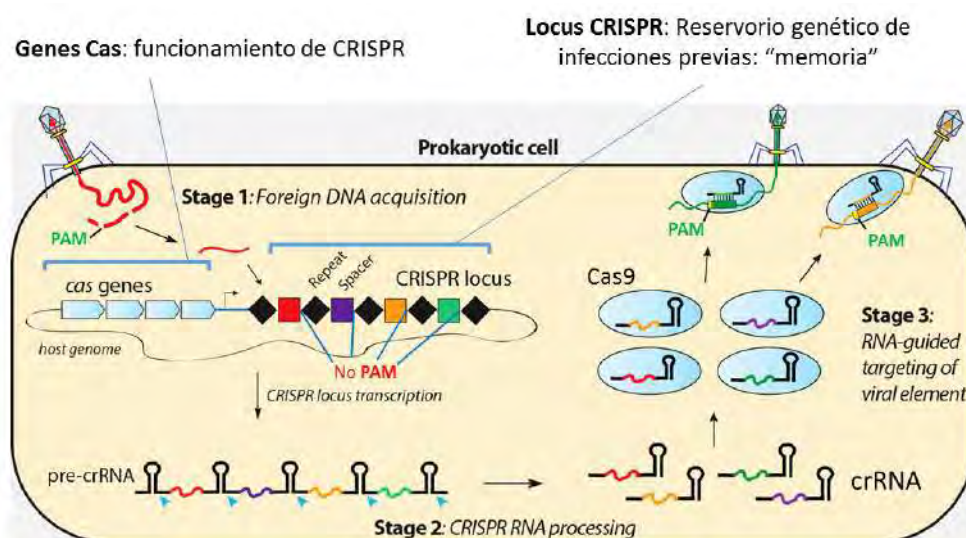


Figura 5. Origen de CRISPR – Inmunidad adaptativa en procariontes. Extraído de <http://bit.ly/37rLwQf>.

Los sistemas CRISPR están generalmente definidos por dos regiones genómicas: un **locus CRISPR** propiamente dicho que funciona como un reservorio genético de infecciones previas (memoria) y los **genes Cas** que constituyen la maquinaria misma de la respuesta inmune (Fig. 5). El locus CRISPR consiste en repeticiones de 20-50 bp separadas por espaciadores variables de similar longitud que son secuencias que provienen del invasor (fragmentos de genomas virales y plásmidos) y constituyen la "memoria" de infecciones pasadas. Los espaciadores se transcriben en ARNs pequeños (crRNA) que son cargados a determinadas proteínas Cas (*CRISPR associated protein*) efectoras y las dirigen hacia sus blancos para reconocer y cortar al ADN (o ARN) del virus (fago) o plásmido invasor (Fig. 5).

Las proteínas Cas efectoras son esencialmente endonucleasas guiadas por ARN, que producen cortes en sus secuencias blanco (algunas cortan ADN y otras ARN) en regiones donde se une por complementariedad de bases el crRNA. El corte, además, se produce solamente cuando las secuencias blanco del ADN invasor se encuentran inmediatamente próximas a otras secuencias llamadas PAM (*Proto-spacer Adjacent Motifs*). En este punto reside una de las claves de la inmunidad CRISPR: las secuencias PAM están solo presentes en las secuencias invasoras y ausentes en el locus CRISPR (Fig. 5). De este modo, el sistema CRISPR le confiere

al organismo la capacidad atacar/cortar solo secuencias no propias y de tolerar secuencias propias (de lo contrario el propio locus CRISPR de la bacteria o arquea sería atacado), reuniendo así todas las características distintivas de un verdadero sistema inmune adaptativo.

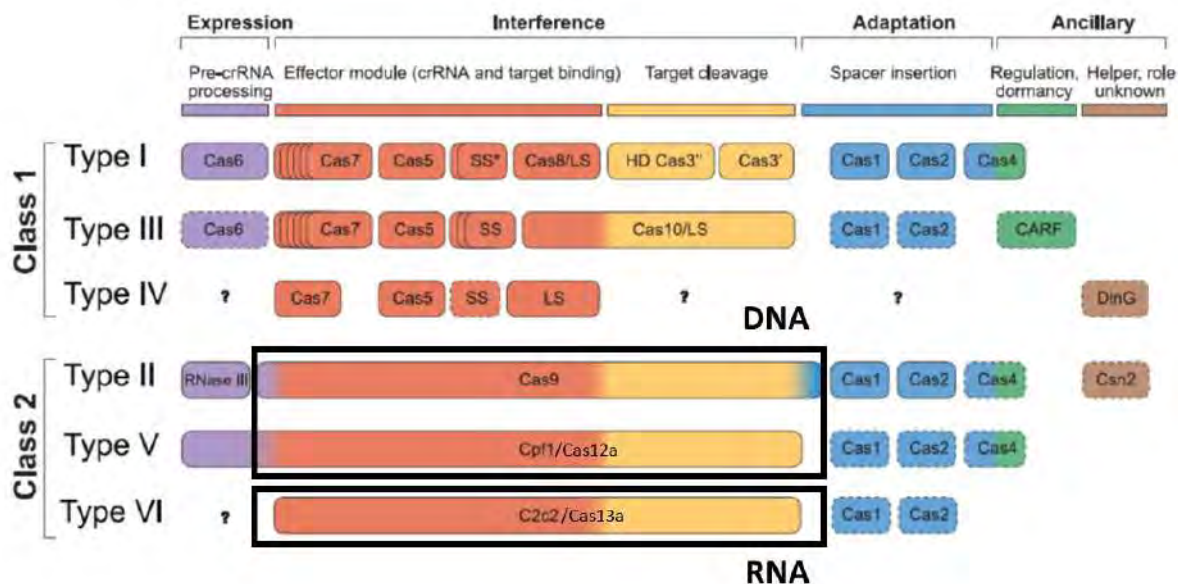


Figura 6. Tipos y mecanismo de CRISPR en procariotas – diversidad de genes Cas. Extraído de Mohanraju *et al.* (2016).

Los sistemas CRISPR/Cas se dividen en dos clases de acuerdo con la similitud de la secuencia entre las proteínas Cas y el locus de CRISPR (Mohanraju *et al.*, 2016). Los sistemas de Clase I, presentes en bacterias y arqueas, están formado por efectores multiproteicos compuestos de 4 a 7 subunidades Cas y constituyen aproximadamente el 90 % de los loci estudiados. Los sistemas de Clase II tienen un módulo efector que consiste de una sola proteína multidominio, como Cas9, Cas12 y Cas13. Aproximadamente el 10 % de los loci estudiados pertenecen a este tipo (Fig. 6). A pesar de su menor abundancia en la naturaleza, por la simple cuestión práctica de que es más fácil clonar y expresar proteínas únicas en lugar de múltiples a la vez, los sistemas de Clase II son los que mejor se han adaptado y popularizado como herramientas de edición de genomas.

ADAPTACIÓN DE CRISPR COMO HERRAMIENTA GENÉTICA

Los avances en la biología molecular de los sistemas CRISPR rápidamente llevaron a que pudieran ser utilizados como herramienta para modificar genomas. En el año 2012, los grupos dirigidos por Emanuelle Charpentier y Jenifer Doudna, descubrieron que la proteína Cas9 puede ser reprogramada para realizar cortes en sitios específicos del ADN (Jinek *et al.*, 2012). La idea sencilla o brillante o revolucionaria de estas investigadoras fue diseñar ARNs quiméricos (artificiales) comúnmente conocidos como sgRNAs que son capaces de guiar a Cas9 hacia sus blancos (Fig. 7A). Los sgRNAs (o guías de ARN) son esencialmente fusiones artificiales de crRNAs con otro ARN estructural (trans-activating crRNA o tracrRNA) que normalmente actúa apareado con (pero como una molécula separada de) los crRNAs y que es necesario para la función normal de los quiméricos. El hecho de que la Cas9 pudiera programarse para inducir cortes en ambas hebras del ADN en lugares específicos a través de una guía de ARN, inmediatamente llevó a que se diseñaran herramientas para manipular genéticamente diversos organismos. Particularmente, en el laboratorio de Feng Zhang del

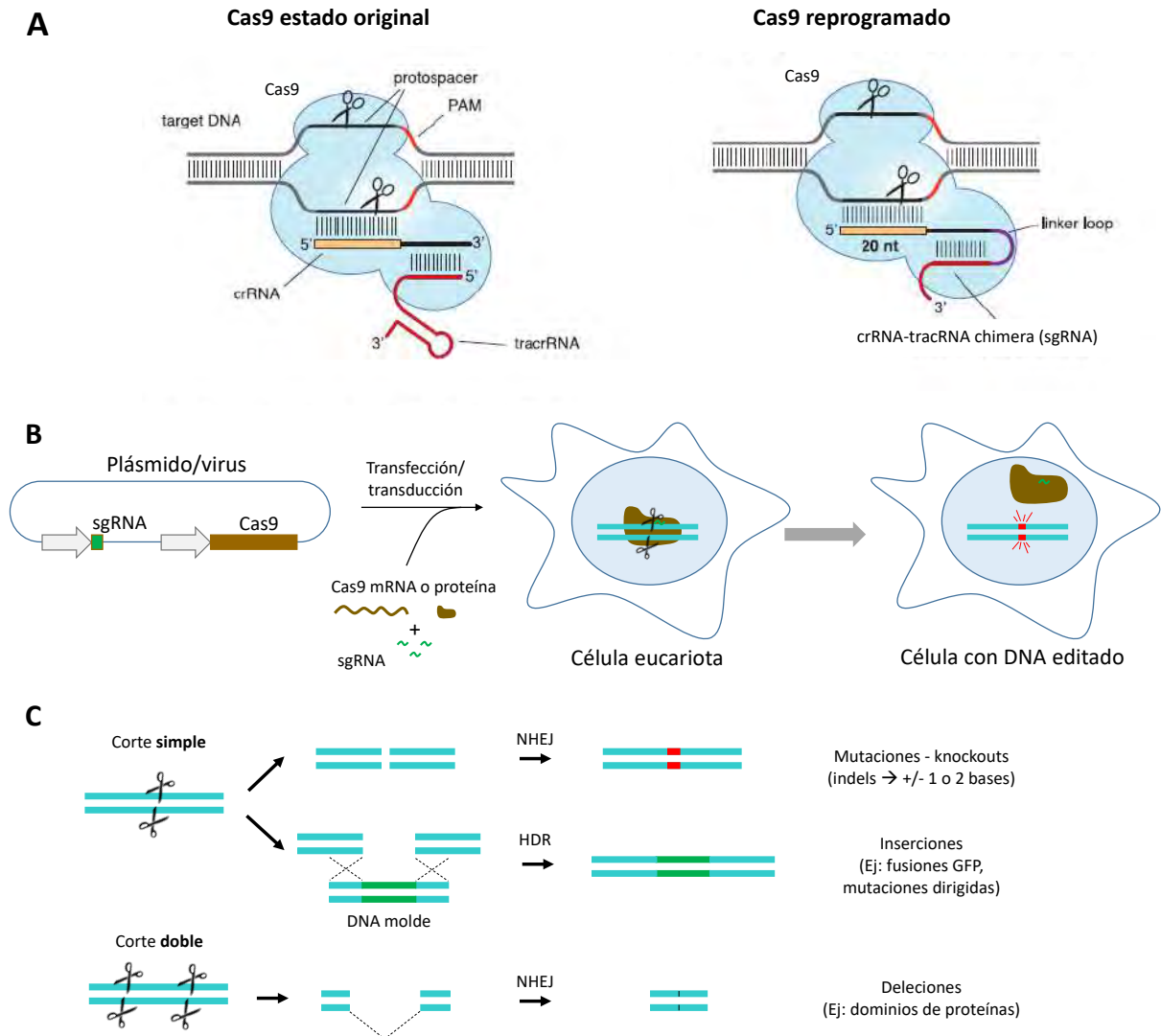


Figura 7. Forma de uso típica de CRISPR en el laboratorio. Edición de **genes individuales** o secuencias de interés. (A) Reprogramación del sistema CRISPR/Cas9 para su aplicación en la edición de genomas. Extraído de Jinek *et al.* (2012). (B) Sistema de dos componentes expresados desde un único vector (plásmido/virus) o componentes pre-sintetizados (Cas9 y sgRNA) introducidos directamente en las células. (C) Tipos más comunes de edición de genomas por CRISPR.

MIT se diseñaron y mejoraron vectores lentivirales capaces de codificar Cas9 y realizar simultáneamente la introducción (*delivery*) de los sgRNAs, lo cual llevó a popularizar las herramientas de CRISPR/Cas9 (Fig. 7B) (Sanjana *et al.*, 2014; Shalem *et al.*, 2014). La aplicación más común de la tecnología CRISPR es la de crear mutaciones por inserciones-deleciones (*indels*) valiéndose de la reparación imperfecta NHEJ que da lugar a la pérdida de función del gen blanco (Fig. 2 y 7C). La eficacia de CRISPR/Cas9 es tan alta que permite hacer cortes bialélicos (es decir, en ambos alelos de cada célula diploide) con alta frecuencia. También pueden realizarse cortes dobles para eliminar fragmentos completos del genoma tales como dominios de proteínas o regiones regulatorias de interés (Fig. 7C). Del mismo modo que como se explicó anteriormente, la tecnología CRISPR

también puede utilizarse para insertar fragmentos de interés en sitios específicos del genoma empleando ADN molde artificiales que se insertan vía HDR (Fig. 2 y 7C). Este tipo de estrategias se están empleando de manera creciente en estudios básicos y aplicados y ya está siendo aplicado en la Argentina, tanto en animales como en plantas (Bevacqua *et al.*, 2016; Castaneda Cortes *et al.*, 2019; Cosentino *et al.*, 2019, Gonzalez *et al.*, 2019).

APLICACIÓN DE CRISPR EN SCREENINGS GENÉTICOS

La relativa facilidad y eficacia del sistema CRISPR/Cas9 llevó a la posibilidad de utilizar CRISPR en *screenings* genéticos directos (*forward genetic screenings*) (Koike-Yusa *et al.*, 2014; Sanjana *et al.*, 2014; Shalem *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2014; Zhou *et al.*, 2014). De manera análoga a la genética clásica, en los *screenings* directos los investigadores aíslan células u organismos con fenotipos de interés (por ejemplo, células con tumorigenicidad aumentada o reducida) partiendo de un conjunto de células u organismos previamente mutagenizados en múltiples sitios del genoma, para luego encontrar el o los genes involucrados en dichos fenotipos. El objetivo final es eventualmente entender los mecanismos moleculares involucrados o intervenirlos (como en el caso de generar una terapia antitumoral específica que silencie un oncogén en particular). Aunque los *screenings* genéticos ya se realizaban previamente con mutágenos químicos o mediante la tecnología de RNAi, la tecnología CRISPR/Cas9 ha posibilitado una mayor robustez y especificidad del método (Shalem *et al.*, 2015). En un *screening* típico de CRISPR/Cas9 (en formato *pool* o “agrupado”) que tiene como objetivo descubrir genes involucrados en el cáncer, se busca mutar o desactivar cientos o miles

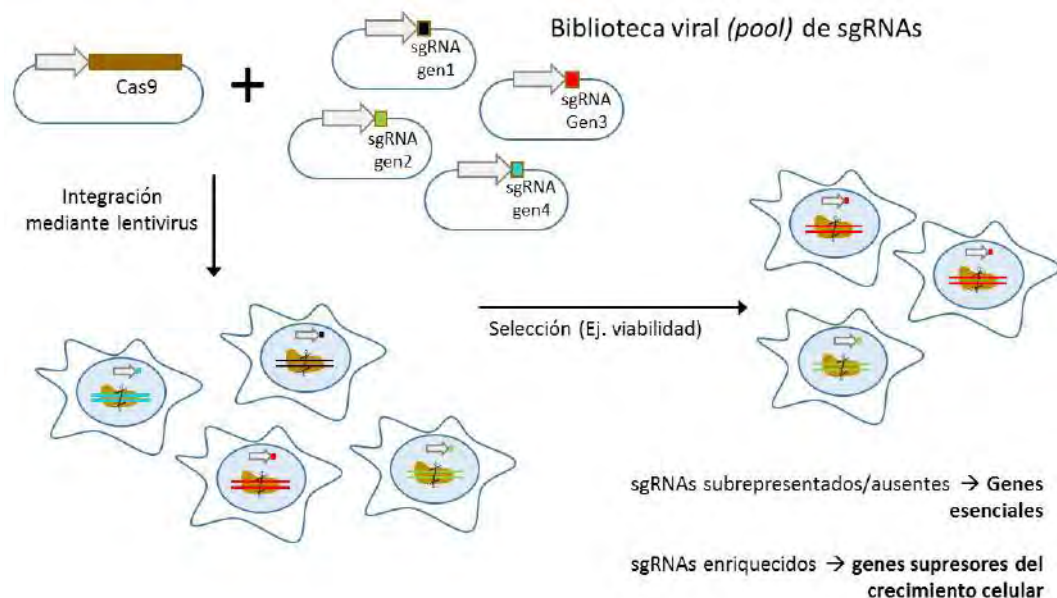


Figura 8. Edición de **múltiples genes** o secuencias: *screenings* genéticos. Una biblioteca de sgRNAs es transducida en las células huésped de manera que la mayoría de las células integren de manera estable un único sgRNA, mutando un único gen. Al finalizar el experimento, a través de secuenciación masiva, se identifican cambios en la distribución de los sgRNAs debido a la presión de selección aplicada. En el caso de selección por viabilidad solo crecerán células con mutaciones que confieran una ventaja en el crecimiento o sean neutrales, por ejemplo genes supresores del crecimiento o genes no esenciales; las mutaciones en genes esenciales (como oncogenes o supresores inmunes) quedarán subrepresentadas o ausentes.

de genes a la vez, cada uno en una célula tumoral independiente y en paralelo (Fig. 8). Para ello se hace uso de una colección o biblioteca (*library*) viral de sgRNAs contra un gran número de genes que permite obtener muestras con miles de células tumorales, cada una con una mutación única y diferente. Dichas células son luego crecidas en cultivo o implantadas en tejidos de ratones donde crecen compitiendo entre sí. El análisis posterior de las células que prevalecen luego de la selección (cada una con un sgRNA y por ende con una mutación distinta) permite identificar qué genes son necesarios y cuáles impiden el desarrollo tumoral. De esta lista de genes surgen potenciales blancos terapéuticos contra los que se podrán dirigir eventuales fármacos (Chen *et al.*, 2015; Virreira Winter *et al.*, 2016). Proyectos de este tipo están siendo conducidos actualmente en la Argentina por grupos multidisciplinares (<http://bit.ly/39xsrgW>).

REGULACIÓN DE GENOMAS POR CRISPR

La proteína Cas9 de *Streptococcus pyogenes* (SpCas9), que es actualmente la herramienta CRISPR más utilizada para editar genomas, es capaz de realizar cortes en ambas hebras del ADN a través de sus dominios RuvC y HNH (Dominguez *et al.*, 2016). Sin embargo, frecuentemente es deseable no generar mutaciones en el genoma sino afectar su funcionalidad o estructura. Para estas aplicaciones se generó una variante de Cas9 con los dominios RuvC y HNH mutados, la cual es incapaz de generar cortes en el ADN pero que mantiene su capacidad de unirse específicamente al ADN cuando es guiada por sgRNAs específicos (Fig. 9A). Esta herramienta se conoce como dCas9 (Cas9 muerta, del inglés dead Cas9) y tiene varias aplicaciones para estudiar la regulación del genoma.

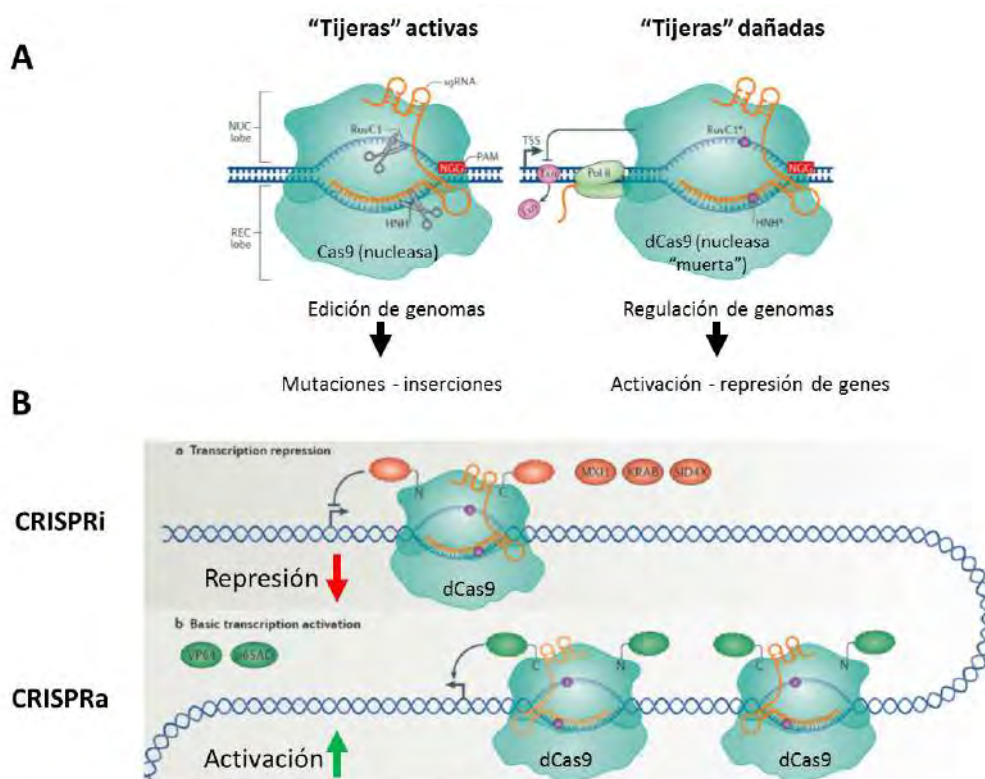


Figura 9. Edición versus Regulación de genes. (A) Cas9 WT permite editar genomas. La mutante dCas9 (“dead Cas9) se une (sin cortar) a secuencias de DNA específicos y permite regular la expresión genes. (B) Represión (CRISPRi) y activación (CRISPRa) transcripcional de genes con dCas9 fusionada a represores o activadores transcripcionales respectivamente. Extraído de Dominguez *et al.* (2016).

En primer lugar, la simple unión de dCas9 a secuencias regulatorias del ADN puede en sí misma dar lugar a la represión transcripcional a través de generar un impedimento estérico, bloqueando la iniciación o la elongación de la ARN polimerasa (Fig. 9A) (Qi *et al.*, 2013). Otras variantes de la proteína dCas9 fusionadas con dominios de activadores transcripcionales como, por ejemplo, el dominio de activación de la forma nuclear del factor de transcripción NF- κ B (p65AD), o VP64 (compuesto de cuatro copias en tándem del dominio de activación VP16 del virus herpes simplex), se utilizan para inducir la activación transcripcional de genes de interés cuando son dirigidas a sus regiones promotoras. Esta estrategia se conoce como **CRISPRa** y en eucariotas se utiliza con éxito para activar tanto genes reporteros como genes endógenos (Fig. 9B) (Gilbert *et al.*, 2013; Maeder *et al.*, 2013). Por el contrario, la fusión de dCas9 con reguladores negativos como el dominio KRAB (Krüppel-associated box), denominada CRISPRi, llevan a la represión transcripcional (Fig. 9B) (Gilbert *et al.*, 2013). **CRISPRi** puede utilizarse para silenciar no sólo genes codificantes sino también ARNs no codificantes y enhancers (Thakore *et al.*, 2015). Tanto CRISPRa como CRISPRi se pueden utilizar en gran escala para realizar screenings genéticos que permiten silenciar genes parcialmente y descubrir funciones que, de lo contrario quedarían enmascaradas en *screenings* que se valen de la pérdida total de su función por medio de CRISPR/Cas9 estándar (Cox *et al.*, 2017).

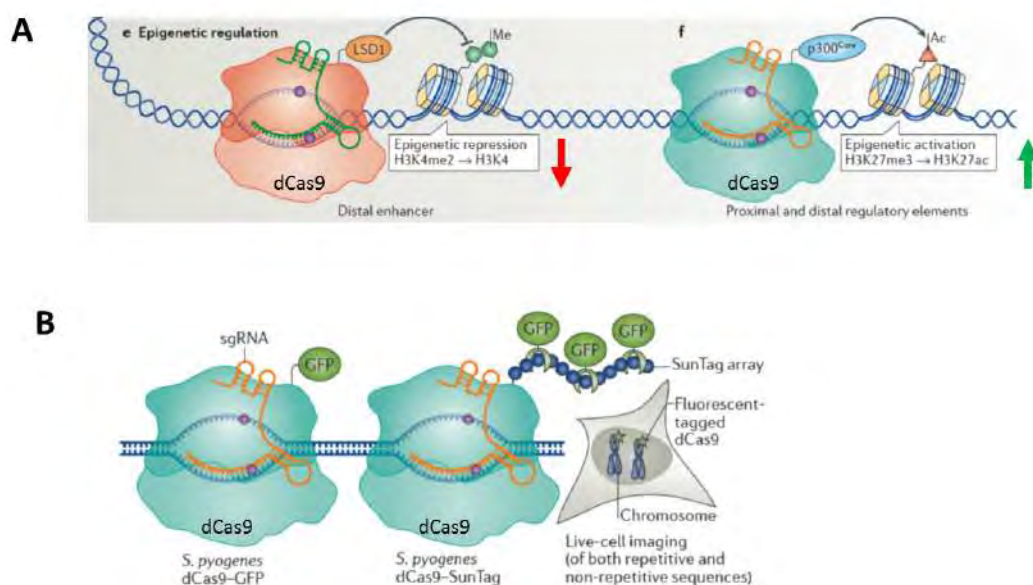


Figura 10. Manipulación de genomas por CRISPR. **(A)** Modificación de la cromatina. **(B)** Colorear regiones del genoma con proteínas fluorescentes fusionadas a dCas9. Extraído de Dominguez, Lim et al. 2016.

Otra aplicación alternativa de dCas9 es la introducción de modificaciones epigenéticas como acetilación, metilación de histonas y de ADN (Dominguez *et al.*, 2016). Si bien es sabido que la epigenética es clave en la regulación de la expresión genética, la simplicidad del diseño de las herramientas CRISPR ofrece un gran potencial para desentrañar las relaciones de causalidad entre las modificaciones epigenéticas y la expresión de genes, lo cual en general se ha basado mayormente en correlaciones (asociaciones estadísticas). Por ejemplo, Hilton *et al.* (2015) fusionaron dCas9 con el dominio acetiltransferasa de histonas de la proteína p300 humana, la cual, a través de sgRNA específicos fue capaz de acetilar H3K27 en *enhancers* y promotores llevando a la activación de genes endógenos (Fig. 10A) (Hilton *et al.*, 2015). Este tipo de herramientas potencialmente facilitará el desarrollo de nuevos modelos animales o en líneas celulares y de terapias génicas para corregir enfermedades.

En relación a estos avances, dCas9 también ha sido adaptada como plataforma para visualizar elementos regulatorios (secuencias de ADN específicas) en células vivas. Chen y col. desarrollaron un sistema que emplea dCas9 fusionada a eGFP, junto con sgRNAs mejorados estructuralmente para interactuar con dCas9. Con esta metodología, ha sido posible visualizar telómeros, genes endógenos y secuencias no repetitivas (Chen *et al.*, 2013). De esta manera, haciendo uso de sgRNAs específicos y de dCas9-eGFP es posible estudiar la conformación y la dinámica de la cromatina (Fig. 10B).

EDICIÓN DE ARN POR CRISPR

Si bien la mayoría de las aplicaciones CRISPR utilizan proteínas Cas que reconocen ADN, más recientemente se adaptaron sistemas CRISPR/Cas que poseen actividad endonucleasa contra ARN (Fig. 6). Estos últimos tienen la ventaja de que producen alteraciones transitorias en la expresión de genes, lo cual evita modificaciones permanentes y efectos *off-target* indeseados en el genoma.

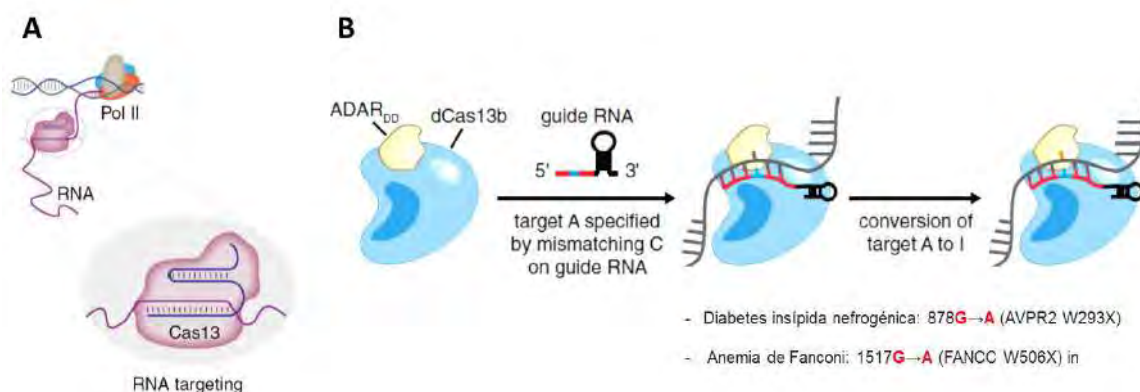


Figura 11. Edición de ARN por CRISPR. **(A)** Cas13 reconoce y corta ARN. Extraído de Adli, M. 2018. **(B)** Mutante dCas13 ("dead Cas13") se une (sin cortar) a ARN y permite editar ARNs específicos. Extraído de Cox *et al.* (2017).

La nucleasa Cas13a (C2c2) es una de las más utilizadas hasta la fecha (Fig. 11A), y ha sido programada para digerir ARNm de manera específica tanto en bacterias como en células eucariotas (Abudayyeh *et al.*, 2016). Al igual que para Cas9, una versión inactiva de Cas13 (dCas13) se diseñó para visualizar ARNm y estudiar su localización subcelular en gránulos de estrés (Abudayyeh *et al.*, 2017). Otro sistema basado en dCas13 es REPAIR (*RNA editing for programmable A to I replacement*), el cual consiste en la fusión de dCas13 a la enzima adenosina deaminasa de ARN. Mediante REPAIR se puede convertir adenosina (A) en inosina (I) en células eucariotas, esta última funcionalmente equivalente con guanosina (G). El sistema ha sido utilizado empleando sgRNAs contra dos secuencias mutadas: 878G→A relacionada con la diabetes insípida nefrogénica; y 1517G→A, involucrada en anemia de Fanconi, logrando alcanzar un 35% de corrección en diabetes y un 23 % en anemia de Fanconi (Fig. 11), lo cual podría ser un resultado prometedor para su aplicación en terapias génicas (Cox *et al.*, 2017). A su vez, el dominio de la adenosine deaminasa se modificó para llevar a cabo la conversión de citidina (C) a uridina (U). Al fusionar este dominio modificado con la dCas13, el grupo de

Zhang generó el sistema RESCUE (RNA Editing for *Specific C to U Exchange*), ampliando el abanico de posibles enfermedades genéticas que podrían ser tratadas con esta tecnología (Abudayyeh *et al.*, 2019).

Aplicación de CRISPR en diagnóstico

La tecnología CRISPR ha demostrado ser una herramienta útil no solamente para la edición de genomas en el contexto de células vivas, sino también para el desarrollo de ensayos bioquímicos para diagnóstico. En este sentido se han comenzado a describir diferentes aplicaciones de CRISPR que prometen ser igualmente revolucionarias que su aplicación tradicional y que actualmente tiene desarrollo local en la Argentina (Curti *et al.*, 2020; Gimenez *et al.*, 2020).

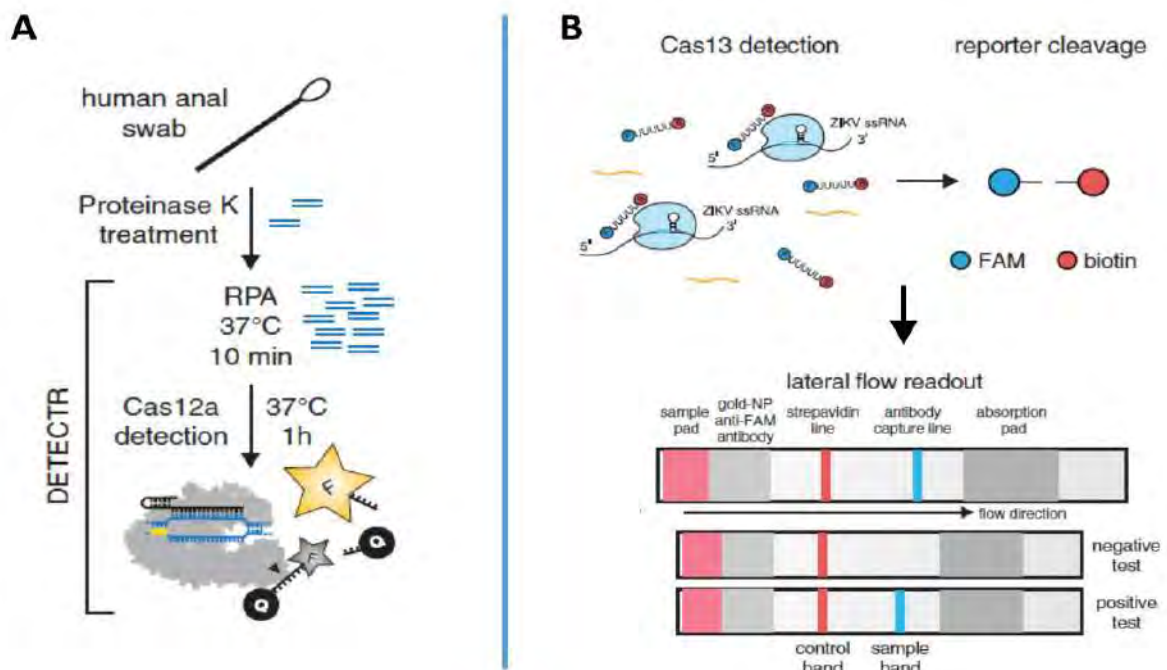


Figura 12. Aplicación de CRISPR en diagnóstico. **(A)** Detección del DNA del virus HPV por DETECTR (fluorescencia). Extraído de Chen, Ma *et al.* 2018. **(B)** Detección del ARN del virus del Zika por SHERLOCK (tira reactiva similar a los utilizados en tests de embarazos). Extraído de Gootenberg *et al.*, 2018.

Estas metodologías están basadas en diferentes proteínas ortólogas de Cas9. En particular la proteína Cas12a (Cpf1) de *Lachnospiraceae bacterium*, cuando es previamente guiada por un sgRNA a su blanco de ADN específico, desata una actividad colateral indiscriminada capaz de digerir ADN simple cadena de manera inespecífica. Un ensayo desarrollado recientemente aprovecha esta actividad por medio de una sonda de ADN simple cadena marcada con un fluorocromo cuya intensidad de fluorescencia aumenta al degradarse la sonda si el ensayo es positivo. Este método, llamado DETECTR (DNA endonuclease- targeted CRISPR trans reporter), permite detectar de manera rápida y precisa el virus del papiloma humano tipos 16 y 18, tanto en células en cultivo como en muestras de pacientes (Fig. 12A) (Chen *et al.*, 2018).

De manera análoga a Cas12a, la proteína Cas13 (C2c2) de *Leptotrichia wadei* (LwCas13a) desata una actividad colateral indiscriminada inespecífica capaz de digerir ARN simple cadena cuando es previamente guiada por un sgrRNA a su blanco de ARN específico. Usando LwCas13a, Gootenberg *et al.* (2017) diseñaron la técnica de SHERLOCK (*specific high sensitivity enzymatic reportes unlockin*), la cual permite detectar cantidades ínfimas de ARN (del orden fM o aM), convirtiéndola en una poderosa herramienta de diagnóstico. Esta metodología fue adaptada para ser utilizada en lugares sin acceso a equipos sofisticados, empleando tiras reactivas similares a los utilizados en los tests de embarazos (Fig. 12B). Esta nueva versión, llamada SHERLOCKv2, es capaz de detectar en poco tiempo muestras infectadas con virus de Dengue, Zika y en la detección de mutaciones en biopsias líquidas en muestras de cáncer de pulmón (Gootenberg *et al.*, 2017; 2018).

Efactor	PAM	Especificidad	Nota
SpCas9	NGG	DNA	Más difundida
SpCas9 (QQR1)	NAAG	DNA	Artificial
SpCas9 (VQR)	NGAG	DNA	Artificial
SpCas9 (VRER)	NGCG	DNA	Artificial
SaCas9	NNAGAAW	DNA	Menor tamaño
NmCas9	NNNNGATT	DNA	
StCas9	NNAGAAW	DNA	
Cas12a/Cpf1	TTN	DNA	Extremos cohesivos
Cas12b/C2c1	ATTN	DNA	Extremos cohesivos
Cas13a/C2c2	No (PFS)	RNA	

Figura 13. “Caja de herramientas” CRISPR. Ejemplos de variantes de proteínas Cas utilizadas en edición de genomas.

LIMITACIONES Y MEJORAS DE LOS SISTEMAS CRISPR

Si bien en relativamente poco tiempo el sistema CRISPR/Cas ha revolucionado la biología molecular, esta tecnología presenta algunas limitaciones. Una de las más evidentes es el hecho de que las proteínas Cas requieren de secuencias PAM inmediatamente próximas a sus secuencias blanco para poder cortar, lo cual restringe la edición a los sitios del genoma que contengan dichas secuencias. Esto ha llevado a explorar nucleasas Cas de distintos microorganismos y variantes artificiales (mutantes) de las nucleasas, cada cual con distintos requerimientos de secuencias PAM y con distinta especificidad de sustrato (ADN o ARN), lo cual ha ampliado el abanico de posibles secuencias que pueden ser editadas (Fig. 13) (Gao *et al.*, 2017; Adli, 2018; Hu *et al.*, 2018; Kleinstiver *et al.*, 2019; Pickar-Oliver & Gersbach 2019; Yan *et al.*, 2019).

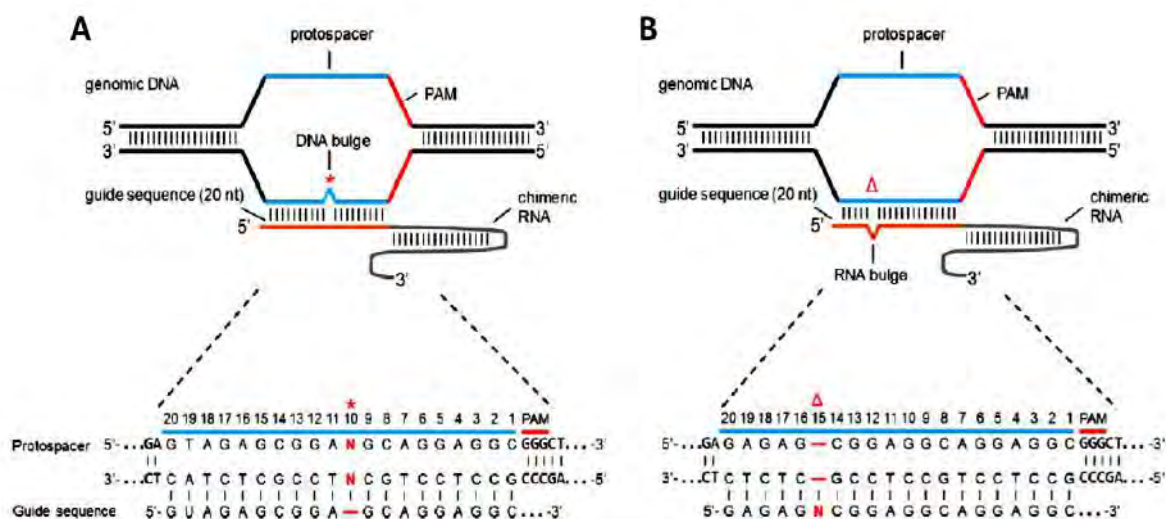


Figura 14. Limitaciones de CRISPR. Efectos no deseados sobre genes inespecíficos (efectos *off-target*). **(A)** Base desapareada (*bulge*) del lado del blanco de DNA, **(B)** Base desapareada (*bulge*) del lado del ARN guía (sgRNA). Extraído de Lin *et al.*, 2014.

Por otro lado SpCas9, que es la proteína Cas más utilizada para editar genomas, presenta la desventaja de ser demasiado grande para ser empaquetada en Virus Adeno Asociados (AAV), que son las partículas virales más usadas en terapia génica (Naso *et al.*, 2017). Para evitar esta limitación se han evaluado otros ortólogos de menor tamaño como Cas9 de *Campylobacter jejuni* (CjCas9) o de *Staphylococcus aureus* Cas9 (SaCas9) (Kim *et al.*, 2017; Glass *et al.*, 2018). Como la inmunogenicidad de SaCas9 junto con la prolongada expresión de SaCas9 dada por la integración de los AAV son factores a tener en cuenta a la hora de los ensayos clínicos (Nelson *et al.*, 2019), algunos enfoques buscan evitar el rechazo a través de rediseñar ciertos epítopes de Cas9, el uso de drogas inmunosupresoras durante el tratamiento o edición de células *ex-vivo* (Ferdosi *et al.*, 2019).

Otra limitación importante de los sistemas CRISPR son los efectos *off-target* producidos por apareamientos inespecíficos de los sgRNAs. Si bien existen herramientas para optimizar el diseño de los sgRNAs (Doench *et al.*, 2016; Haeussler *et al.*, 2016), en ocasiones pueden ocurrir cortes no deseados. Esto se debe a que ciertos apareamientos parciales de sgRNAs con blancos inespecíficos ocurren a través de bases no apareadas (*mismatches* o *bulges*) (Fig. 14), y en algunos casos esto alcanza para guiar a Cas9 a cortar dichos blancos (Lin *et al.*, 2014). Para hacer frente a las limitaciones de especificidad propias de Cas9, se han diseñado diversas estrategias entre las que se incluyen modificaciones en los dominios de la Cas9. En particular, a través de introducir mutaciones en los dominios RuvC (D10A) o HNH (840A), se han generado variantes de Cas9 capaces de producir cortes en una sola de las hebras del ADN (*nicks*) en lugar de hacer cortes en ambas hebras (Fig. 15A). Estas variantes se denominan *nickasas* y pueden ser combinadas de a pares para realizar cortes en la doble hebra y permitir ediciones de mucha mayor especificidad que con la Cas9 salvaje (Fig. 15B). De hecho, esta estrategia disminuye los efectos *off-target* entre 50 a 1500 veces en líneas celulares y facilita el noqueo de genes en cigotos de ratón sin sacrificar la eficiencia de los cortes específicos (Ran *et al.*, 2013).

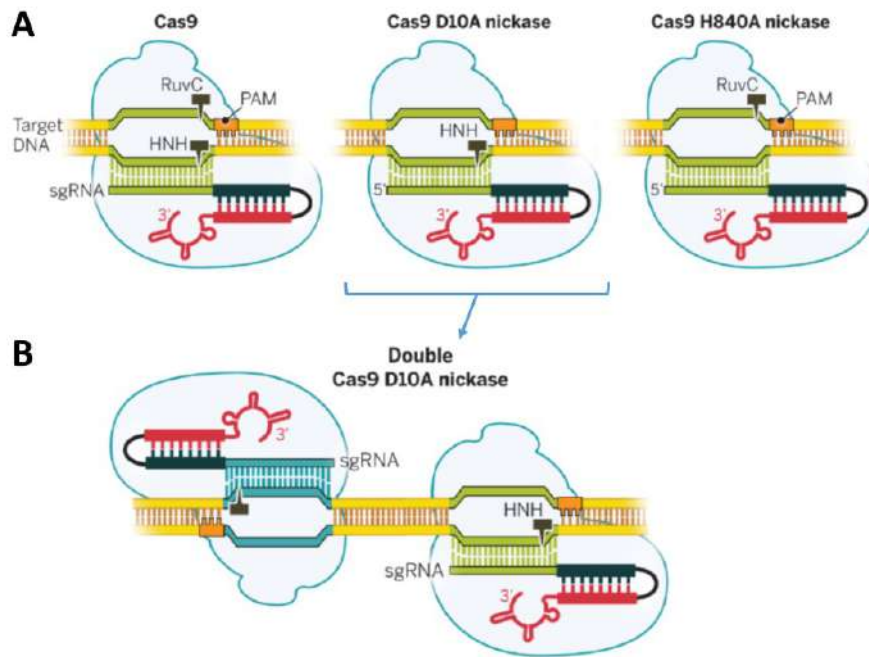


Figura 15. Mejoras a las limitaciones de CRISPR. **(A)** Reingeniería de Cas9. Los dos dominios con actividad nucleasa de Cas9 (RuvC y HNH) pueden ser independientemente mutados para generar variantes de Cas9 con la capacidad de cortar solo una de las hebras de la doble hélice de DNA, conocidas como Cas9 *nickasas*. **(B)** Combinar dos *nickasas* reduce entre 50 a 1.500 veces los efectos *off-target* en comparación a Cas9 salvaje. Extraída de Doudna J.A. y Charpentier E. (Doudna & Charpentier, 2014).

Utilizando *nickasas* de Cas9 se han logrado los avances más recientes de la tecnología CRISPR que permiten realizar inserciones o ediciones tan específicas como las logradas a través de HDR pero con una fidelidad y simplicidad sin precedentes. A través de los denominados “editores de bases”, que consisten en fusiones de *nickasas* de Cas9 con enzimas deaminasas de nucleótidos, es posible reemplazar bases específicas del genoma con gran precisión (Komor *et al.*, 2016; Nishida *et al.*, 2016; Gaudelli *et al.*, 2017; Tan *et al.*, 2020). De modo similar, por medio de fusionar una *nickasa* de Cas9 con la enzima transcriptasa reversa y variantes modificadas de sgRNAs, ahora es concebible corregir errores presente en una infinidad de enfermedades genéticas disminuyendo los riesgos de efectos no deseados (Anzalone *et al.*, 2019). El gran potencial de estos métodos reside en que funcionan sin la necesidad de utilizar moldes de ADN exógenos que actúan vía la maquinaria de HDR, lo cual los convierte en métodos más aplicables a las terapias génicas para corregir enfermedades o a fines biotecnológicos en distintas especies (Liang *et al.*, 2017; Lu & Zhu 2017; Rees *et al.*, 2017; Shimatani *et al.*, 2017; Kim, 2018; Zhang *et al.*, 2019).

APLICACIONES DE CRISPR CON FINES TERAPÉUTICOS

Las herramientas CRISPR han empezado a ser aplicadas en investigación preclínica (modelos animales) y en ensayos clínicos (pacientes humanos). De hecho, se encuentran en marcha en la actualidad diversos ensayos clínicos diseñados para curar enfermedades como infecciones virales, enfermedades degenerativas y cáncer (Li *et al.*, 2020). Las dos estrategias en desarrollo para utilizar CRISPR en la clínica son la edición de genomas *ex vivo* e *in vivo*, en las cuales los componentes de CRISPR se introducen en las células de mamíferos en la forma de ADN, ARN o RNPs. Sin embargo, al igual que para las terapias génicas en general, es justamente el *delivery* de dichos componentes en la célula lo que representa el mayor desafío a la hora de aplicar

exitosamente esta tecnología (Yin *et al.*, 2017, Glass *et al.*, 2018). Los métodos más utilizados incluyen métodos como la electroporación para aplicaciones *ex vivo* y vectores virales (lentivirus y *adeno-associated virus* o AAV) para aplicaciones *in vivo* (Yin *et al.*, 2017; Glass *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2019). Más recientemente se han desarrollado biomateriales como nanopartículas (lipídicas, poliméricas o inorgánicas) para usos *in vivo* (Glass *et al.*, 2018; Wan *et al.*, 2019).

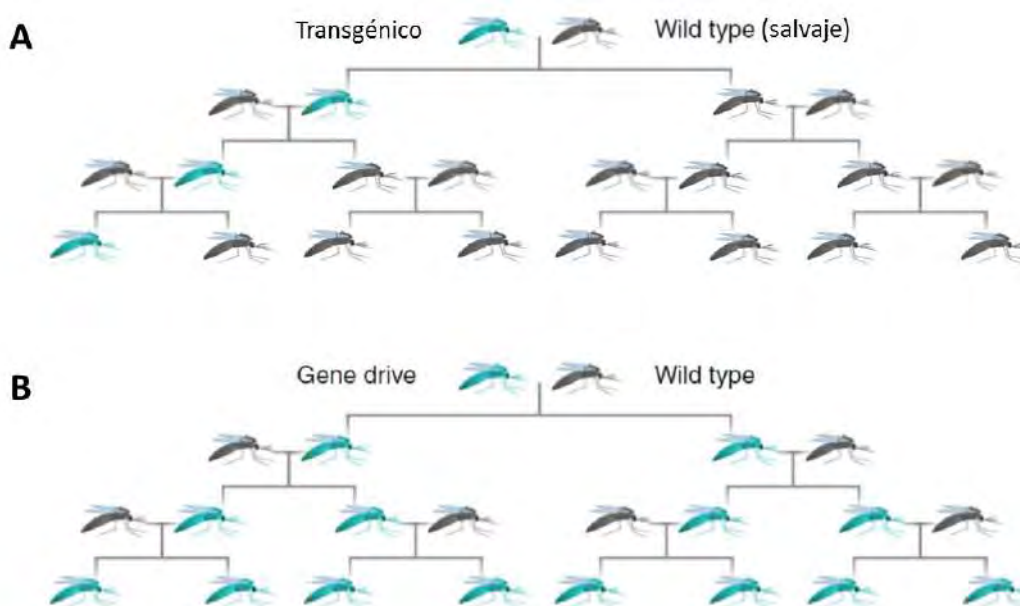


Figura 16. Impulsores genéticos o Gene drives. Escenarios posibles en caso de liberar animales conteniendo transgenes o impulsores genéticos al ecosistema natural. (A) Herencia mendeliana clásica para un transgén. (B) Herencia no mendeliana o “super-mendeliana” (genes egoístas) para un gene drive. Adaptado de Esvelt *et al.* (2014).

Las estrategias *ex vivo* (es decir aquellas en las que se extraen células de paciente, se las edita en cultivo y se las reinyecta en pacientes) son actualmente las más establecidas en las aplicaciones clínicas de CRISPR. Una de las mayores promesas actuales es editar y reimplantar células madre hematopoyéticas (HSPCs) en el tratamiento de enfermedades hematológicas como la anemia de células falciformes y la beta-talasemia (De Ravin *et al.*, 2017; Humbert *et al.*, 2019; Park *et al.*, 2019; Wu *et al.*, 2019). Por otro lado, la edición de células madre inducidas pluripotentes (iPSCs) ha emergido como un posible tratamiento a la distrofia muscular de Duchenne (DMD), una enfermedad muscular degenerativa causada por mutaciones en el gen distofina (Li *et al.*, 2015).

Aunque relativamente menos establecidos, existen también avances en la utilización de CRISPR *in vivo*. En particular para el tratamiento de DMD en modelos animales, en enfermedades genéticas oculares (amaurosis congénita de Leber), enfermedades genéticas hepáticas (tirosinemia, deficiencia de alfa-1 antitripsina, hipercolesterolemia) y en cáncer (metástasis de tumores pancreáticos, osteosarcoma, metástasis en pulmón) (Li *et al.*, 2020).

APLICACIONES (CONTROVERTIDAS) DE CRISPR

Además de permitir la edición de genomas de organismos individuales, actualmente CRISPR está posibilitando la ingeniería de ecosistemas, es decir, la edición de genomas de poblaciones enteras. Estos desarrollos, conocidos como *gene drives* (GD) o impulsores genéticos, son una de las posibles aplicaciones de CRISPR que más inquietud despierta en la comunidad y que más controversias genera por sus posibles implicancias ecológicas, políticas y éticas (Brossard *et al.*, 2019).

La motivación para desarrollar los GD ha sido la de introducir y propagar características deseadas - como resistencia a una enfermedad- en poblaciones silvestres de las especies de interés. En este sentido, los GD se han propuesto como herramientas para controlar plagas, revertir resistencias a herbicidas y reducir o eliminar insectos que transmiten enfermedades, siendo los mosquitos que transmiten malaria o dengue los ejemplos más citados (Curtis, 1968).

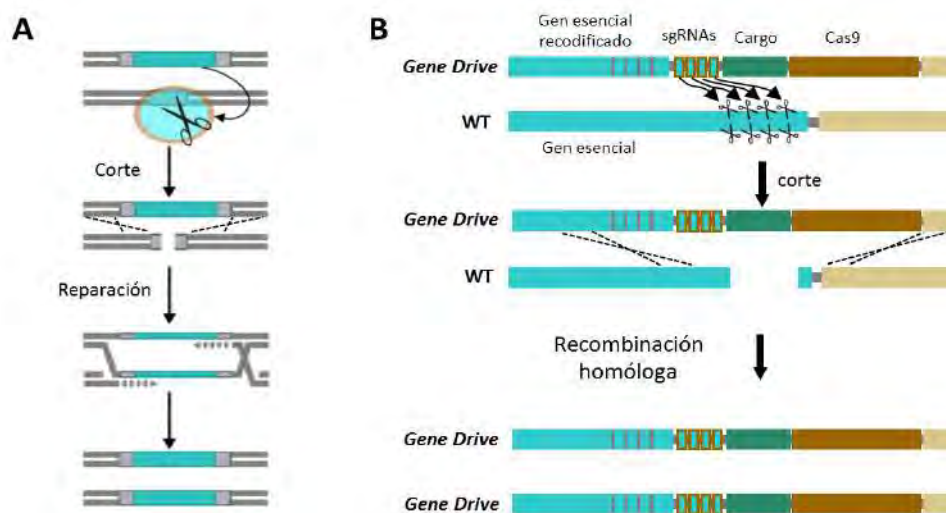


Figura 17. Impulsores genéticos o *Gene drives*. (A) Mecanismo de los *Gene drives*: una vez insertados en el genoma del huésped, cortan al cromosoma homólogo a través de su actividad endonucleasa e inducen a la reparación del ADN por recombinación homóloga, copiándose a sí mismo y distorsionando la herencia a su favor. Extraído de Esvelt *et al.*, 2014. (B) Los *Gene drives* basados en CRISPR tienen el potencial de transmitir genes de interés (genes cargo).

Los GD son esencialmente elementos genéticos artificiales que confieren características deseadas en los organismos que los contienen. Pero, a diferencia de los transgenes clásicos que se transmiten por herencia mendeliana, los GD funcionan distorsionando la herencia a su favor favoreciendo así su rápida dispersión en poblaciones enteras (Fig. 16) (Champer *et al.*, 2016). El mecanismo de los GD ocurre de forma natural en el caso de “genes egoístas” como las *homing nucleases*, las cuales son capaces de inducir cortes (daño) en el sitio opuesto del cromosoma homólogo que las contiene, de manera tal que al inducirse el proceso de reparación celular (por recombinación homóloga) se genera una copia de sí misma en el cromosoma dañado (Fig. 17A). Los investigadores han imitado este fenómeno a través de generar los GD que, además de heredarse de manera análoga a las *homing nucleases*, poseen elementos genéticos (cargos) que expresan caracteres de interés (Fig. 17B).

Por medio de CRISPR/Cas los GD son concebibles en casi cualquier organismo que se multiplique por reproducción sexual. A través de esta tecnología, sería posible modificar el genoma de las plagas (mosquitos, ratas, entre otras) de modo que, por ejemplo, contengan una versión dañada de un gen necesario para la fertilidad de la hembra. Luego de ser introducidas en un territorio aislado, estas podrían aparearse con individuos silvestres teniendo como resultado que toda su progenie herede ese gen dañado. Cuando esta progenie luego se aparee con otros individuos salvajes, en pocas generaciones toda su descendencia también heredará el gen dañado, de esta manera se genera una población de hembras infértiles, que eventualmente llevarían a la desaparición de esa especie en el territorio en cuestión. Las pruebas de concepto ya funcionan en el laboratorio y han sido demostradas para el vector de la malaria, el mosquito *Anopheles stephensi* hembra. En un trabajo reciente se logró convertir a una población experimental de mosquitos en resistentes al parásito *Plasmodium falciparum* (Gantz *et al.*, 2015).

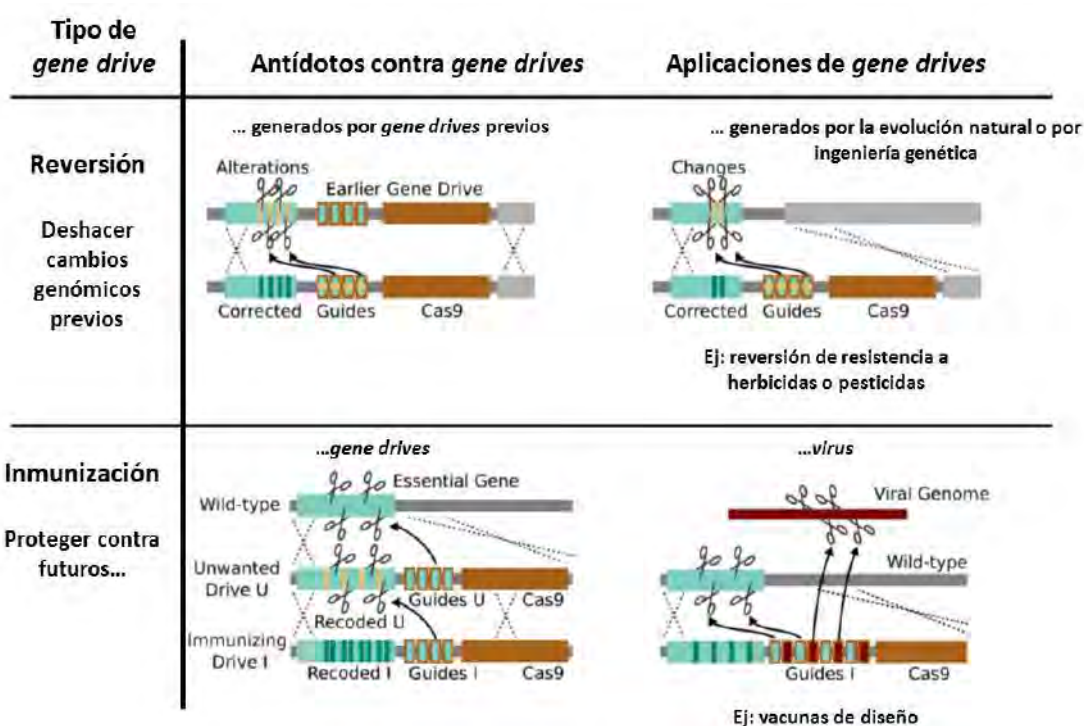


Figura 18. Antídotos y aplicaciones de *gene drives*. Adaptado de Esvelt *et al.*, (2014).

Actualmente, las dudas acerca de si los gene drives son factibles o no han sido suplantadas por otros interrogantes como cuán eficaces serán, cómo testearlos y quién debería regular estos desarrollos (Scudellari, 2019). De hecho en nuestro país esta tecnología sería una forma concebible de erradicar enfermedades endémicas como el mal de Chagas-Mazza, el Dengue o el Zika. La aparente eficacia de los GD y las preocupaciones que desatan han inducido a investigadores a pensar y desarrollar posibles medidas de contención o reversión de los GD en caso de ser necesario frenar o revertir sus posibles efectos nocivos (Fig. 18). En este sentido, existe un creciente interés por parte del gobierno de los Estados Unidos de Norteamérica en los GD, lo cual se evidencia en el hecho de que la Agencia DARPA (Depto. de defensa de los Estados Unidos de Norte América) invirtió, tan solo en 2017, 65 millones de dólares para siete grupos que estudian cómo controlar, contrarrestar y revertir impulsores genéticos (Scudellari, 2019).

Otra de las aplicaciones posibles más controvertidas de CRISPR es la de prevenir enfermedades o introducir caracteres deseados (“Humanos de diseño”). Si bien en la mayoría de los casos todavía no sabemos cuál es la información genética responsables de dichos caracteres, CRISPR permitiría introducir modificaciones potencialmente heredables en humanos, lo cual plantea serias consideraciones éticas. En noviembre de 2018 se hizo viral el caso de un investigador chino, He Jiankui, quien declaró crear los primeros bebés modificados genéticamente (Cyranoski & Ledford, 2018). Según el investigador, **que fue recientemente sentenciado a prisión** por estos hechos, los bebés contienen una mutación en el gen CCR5 que es natural en el 10 % de los europeos y que protege de la infección a HIV. Más allá de las fuertes consideraciones éticas que este hecho implica, existen además consideraciones prácticas. Por un lado, se desconocen los posibles efectos *off-target* que puedan haber adquirido dichos bebés. Por otro lado, el gen CCR5 en su estado salvaje protege contra la infección por el virus del Nilo occidental, con lo cual una putativa protección contra el HIV puede haber dejado a dichos bebés vulnerables a las infecciones por este otro virus (Glass *et al.*, 2005; 2006). Este hecho ha llevado a investigadores proponer una moratoria que suspenda todos los usos clínicos de la edición de genomas en la línea germinal, es decir, aquellos que produzcan cambios heredables en el ADN (en espermatozoides, ovocitos y embriones) para obtener niños modificados genéticamente. Esta moratoria llama a establecer un marco de referencia internacional que promueva acuerdos sobre seguridad y ética antes de aprobar la edición de genomas, al tiempo que advierte sobre la distinción entre “corrección genética” (cura de enfermedades) y “mejora genética” (prevención de enfermedades, incremento de aptitudes físicas, o nuevas funciones) (Dzau *et al.*, 2019; Lander *et al.*, 2019; Wolinetz & Collins, 2019).

CONCLUSIONES, DESAFÍOS PENDIENTES Y PERSPECTIVAS FUTURAS

En los últimos años la tecnología CRISPR/Cas ha revolucionado nuestra capacidad de manipular genomas y promete generar futuras e inminentes aplicaciones disruptivas. Su simplicidad y bajo costo, además de su alta eficacia, han llevado a una gran masividad en su uso, sirviendo de catalizador en las investigaciones de genética, medicina molecular y biotecnología. Sin embargo, existen aún grandes desafíos por resolver, tanto prácticos como éticos, en relación a la especificidad de CRISPR, su seguridad y el posible impacto ecológico de sus aplicaciones. Esto implica lograr consensos y buenas prácticas que atiendan dichas cuestiones. Por último, en tiempos en los cuales es habitual escuchar sobre presuntos antagonismos entre ciencia básica y aplicada, la metodología CRISPR ha emergido como un nuevo ejemplo de que estas disciplinas no funcionan como compartimentos estancos de la ciencia, sino como partes íntimamente entrelazadas de una única actividad intrínsecamente humana.

AGRADECIMIENTOS

Este artículo está basado en la presentación realizada por Manuel de la Mata en la Jornada científica "CRISPR, la nueva biotecnología del Siglo XXI" organizada por la Academia Nacional de Farmacia y Bioquímica el 19 de septiembre de 2019. Agradecemos a la Academia Nacional de Farmacia y Bioquímica por esta invitación y a los Dres. Alberto Díaz y Omar Coso por convocarnos para este evento.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abudayyeh O. O., J.S. Gootenberg, S. Konermann, J. Joung, I.M. Slaymaker, D.B. Cox, *et al.* (2016) C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector. *Science* **353**(6299): aaf5573.
- Abudayyeh O.O., J.S. Gootenberg, P. Essletzbichler, S. Han, J. Joung, J.J. Belanto, *et al.* (2017) RNA targeting with CRISPR-Cas13. *Nature* **550**(7675): 280-284.
- Abudayyeh O.O., J.S. Gootenberg, B. Franklin, J. Koob, M.J. Kellner, A. Ladha, *et al.* (2019) A cytosine deaminase for programmable single-base RNA editing. *Science* **365**(6451): 382-386.
- Adli M. (2018) The CRISPR tool kit for genome editing and beyond. *Nat. Commun.* **9**(1): 1911.
- Anzalone A.V., P.B. Randolph, J.R. Davis, A.A. Sousa, L.W. Koblan, J.M. Levy, *et al.* (2019) Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. *Nature* **576**(7785): 149-157.
- Avery O.T., C.M. Macleod & M. McCarty (1944) Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of Pneumococcal types: induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from Pneumococcus type III. *The Journal of experimental medicine* **79**(2): 137-158.
- Baker K.E. & R. Parker (2004) Nonsense-mediated mRNA decay: terminating erroneous gene expression. *Curr. Opin. Cell Biol.* **16**(3): 293-299.
- Bevacqua R.J., R. Fernandez-Martin, V. Savy, N.G. Canel, M.I. Gismondi, W.A. Kues, *et al.* (2016) Efficient edition of the bovine PRNP prion gene in somatic cells and IVF embryos using the CRISPR/Cas9 system. *Theriogenology* **86**(8): 1886-1896.e1881.
- Brossard D., P. Belluck, F. Gould & C.D. Wirz (2019) Promises and perils of gene drives: Navigating the communication of complex, post-normal science. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **116**(16): 7692-7697.
- Caplan A.L., B. Parent, M. Shen & C. Plunkett (2015) No time to waste--the ethical challenges created by CRISPR: CRISPR/Cas, being an efficient, simple, and cheap technology to edit the genome of any organism, raises many ethical and regulatory issues beyond the use to manipulate human germ line cells. *EMBO Rep.* **16**(11): 1421-1426.
- Castaneda Cortes D.C., L.F.A. Padilla, V.S. Langlois, G.M. Somoza & J.I. Fernandino (2019) The central nervous system acts as a transducer of stress-induced masculinization through corticotropin-releasing hormone B. *Development* **146**(8): dev172866. doi:10.1242/dev.172866
- Champer J., A. Buchman & O.S. Akbari (2016) Cheating evolution: engineering gene drives to manipulate the fate of wild populations. *Nat. Rev. Genet.* **17**(3): 146-159.
- Chen B., L.A. Gilbert, B.A. Cimini, J. Schnitzbauer, W. Zhang, G.W. Li, *et al.* (2013) Dynamic imaging of genomic loci in living human cells by an optimized CRISPR/Cas system. *Cell* **155**(7): 1479-1491.
- Chen J.S. & J. A. Doudna (2017) The chemistry of Cas9 and its CRISPR colleagues. *Nature Reviews Chemistry* **1**(10): 0078.
- Chen J.S., E. Ma, L.B. Harrington, M. Da Costa, X. Tian, J.M. Palefsky, *et al.* (2018) CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity. *Science* **360**(6387): 436-439.
- Chen S., N.E. Sanjana, K. Zheng, O. Shalem, K. Lee, X. Shi, *et al.* (2015) Genome-wide CRISPR screen in a mouse model of tumor growth and metastasis. *Cell* **160**(6): 1246-1260.
- Cosentino M.S., C. Oses, C. Vazquez Echegaray, C. Solari, A. Waisman, Y. Alvarez, *et al.* (2019) Kat6b Modulates Oct4 and Nanog Binding to Chromatin in Embryonic Stem Cells and Is Required for Efficient Neural Differentiation. *J. Mol. Biol.* **431**(6): 1148-1159.
- Cox D.B.T., J.S. Gootenberg, O.O. Abudayyeh, B. Franklin, M.J. Kellner, J. Joung, *et al.* (2017) RNA editing with CRISPR-Cas13. *Science* **358**(6366): 1019-1027.
- Curti L.A., F. Pereyra-Bonnet, G.D. Repizo, J.V. Fay, K. Salvatierra, M.J. Blariza, D. Ibañez-Alegre, A.R. Rinflerch, M. Miretti & C.A. Gimenez (2020) CRISPR-based platform for carbapenemases and emerging viruses detection using Cas12a (Cpf1) effector nuclease. *Emerging Microbes & Infections* **9**(1): 1140-1148, DOI: 10.1080/22221751.2020.1763857
- Curtis C.F. (1968) Possible use of translocations to fix desirable genes in insect pest populations. *Nature* **218**: 368-369.
- Cyranoski D. & H. Ledford (2018) Genome-edited baby claim provokes international outcry. *Nature* **563**(7733): 607-608.
- De Ravin S.S., L. Li, X. Wu, U. Choi, C. Allen, S. Koontz, *et al.* (2017) CRISPR-Cas9 gene repair of hematopoietic stem cells from patients with X-linked chronic granulomatous disease. *Sci. Transl. Med.* **9**(372).
- de Silva, E. & M.P. Stumpf (2004) HIV and the CCR5-Delta32 resistance allele. *FEMS Microbiol. Lett.* **241**(1): 1-12.
- Dever D.P., R.O. Bak, A. Reinisch, J. Camarena, G. Washington, C.E. Nicolas, *et al.* (2016) CRISPR/Cas9 beta-globin gene targeting in human haematopoietic stem cells. *Nature* **539**(7629): 384-389.

- Doench J.G., N. Fusi, M. Sullender, M. Hegde, E.W. Vaimberg, K.F. Donovan, *et al.* (2016) Optimized sgRNA design to maximize activity and minimize off-target effects of CRISPR-Cas9. *Nat. Biotechnol.* **34**(2): 184-191.
- Dominguez A.A., W.A. Lim & L.S. Qi (2016) Beyond editing: repurposing CRISPR-Cas9 for precision genome regulation and interrogation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **17**(1): 5-15.
- Doudna J.A. & E. Charpentier (2014) Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* **346**(6213): 1258096.
- Dzau V.J., M. McNutt & V. Ramakrishnan (2019). Academies' action plan for germline editing. *Nature* **567**(7747): 175.
- Esvelt K.M., A.L. Smidler, F. Catteruccia & G.M. Church (2014) Concerning RNA-guided gene drives for the alteration of wild populations. *Elife* **3**. <https://elifesciences.org/articles/03401>
- Ferdosi S.R., R. Ewaisha, F. Moghadam, S. Krishna, J.G. Park, M.R. Ebrahimkhani, *et al.* (2019) Multifunctional CRISPR-Cas9 with engineered immunosilenced human T cell epitopes. *Nature Communications* **10**(1): 1842.
- Flannick J., G. Thorleifsson, N.L. Beer, S.B. Jacobs, N. Grarup, N.P. Burt, *et al.* (2014) Loss-of-function mutations in SLC30A8 protect against type 2 diabetes. *Nat. Genet.* **46**(4): 357-363.
- Franklin R.E. & R.G. Gosling (1953) Molecular configuration in sodium thymonucleate. *Nature* **171**(4356): 740-741.
- Gaj T., C.A. Gersbach & C.F. Barbas III (2013) ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends Biotechnol.* **31**(7): 397-405.
- Gantz V.M., N. Jasinskiene, O. Tatarenkova, A. Fazekas, V.M. Macias, E. Bier, *et al.* (2015) Highly efficient Cas9-mediated gene drive for population modification of the malaria vector mosquito *Anopheles stephensi*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **112**(49): E6736-6743.
- Gao L., D.B.T. Cox, W.X. Yan, J.C. Manteiga, M.W. Schneider, T. Yamano, *et al.* (2017) Engineered Cpf1 variants with altered PAM specificities. *Nature Biotechnology* **35**(8): 789-792.
- Gaudelli N.M., A.C. Komor, H.A. Rees, M.S. Packer, A.H. Badran, D.I. Bryson, *et al.* (2017) Programmable base editing of A*T to G*C in genomic DNA without DNA cleavage. *Nature* **551**(7681): 464-471.
- Giani A. M., G. R. Gallo, L. Gianfranceschi & G. Formenti (2020) Long walk to genomics: History and current approaches to genome sequencing and assembly. *Comput Struct Biotechnol. J.* **18**: 9-19.
- Gilbert L.A., M.H. Larson, L. Morsut, Z. Liu, G.A. Brar, S.E. Torres, *et al.* (2013) CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes. *Cell* **154**(2): 442-451.
- Gimenez C.A., L. Curti, S.H. Hyon, L. Grosembacher, P.J. Ross P, F. Pereyra-Bonnet (2020) Activation of pancreatic β -cell genes by multiplex epigenetic *CRISPR-editing*. *bioRxiv* doi: <https://doi.org/10.1101/2020.07.24.214544>
- Glass W.G., J.K. Lim, R. Cholera, A.G. Pletnev, J.L. Gao & P.M. Murphy (2005) Chemokine receptor CCR5 promotes leukocyte trafficking to the brain and survival in West Nile virus infection. *J. Exp. Med.* **202**(8): 1087-1098.
- Glass W.G., D.H. McDermott, J.K. Lim, S. Lekhong, S.F. Yu, W.A. Frank, *et al.* (2006) CCR5 deficiency increases risk of symptomatic West Nile virus infection. *J. Exp. Med.* **203**(1): 35-40.
- Glass Z., M. Lee, Y. Li & Q. Xu (2018) Engineering the Delivery System for CRISPR-Based Genome Editing. *Trends Biotechnol.* **36**(2): 173-185.
- Gonzalez M.N., G.A. Massa, M. Andersson, H. Turesson, N. Olsson, A.S. Falt, *et al.* (2019) Reduced Enzymatic Browning in Potato Tubers by Specific Editing of a Polyphenol Oxidase Gene via Ribonucleoprotein Complexes Delivery of the CRISPR/Cas9 System. *Front. Plant Sci.* **10**: 1649.
- Gootenberg J.S., O.O. Abudayyeh, J.W. Lee, P. Essletzbichler, A.J. Dy, J. Joung, *et al.* (2017) Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2. *Science* **356**(6336): 438-442.
- Gootenberg J.S., O.O. Abudayyeh, M.J. Kellner, J. Joung, J.J. Collins & F. Zhang (2018) Multiplexed and portable nucleic acid detection platform with Cas13, Cas12a, and Csm6. *Science* **360**(6387): 439-444.
- Griffith F. (1928). The Significance of Pneumococcal Types. *The Journal of Hygiene* **27**(2): 113-159.
- Griffiths A.J.F., S.R. Wessler, S.B. Carroll & J. Doebley (2012) *"Introduction to Genetic Analysis"*. 10th. Edition, W. H. Freeman and Company.
- Haessler M., K. Schonig, H. Eckert, A. Eschstruth, J. Mianne, J.B. Renaud, *et al.* (2016) Evaluation of off-target and on-target scoring algorithms and integration into the guide RNA selection tool CRISPOR. *Genome Biol.* **17**(1): 148.

- Hershey A.D. & M. Chase (1952) Independent functions of viral protein and nucleic acid in growth of bacteriophage. *The Journal of General Physiology* **36**(1): 39-56.
- Hilton I.B., A.M. D'Ippolito, C.M. Vockley, P.I. Thakore, G.E. Crawford, T.E. Reddy, *et al.* (2015) Epigenome editing by a CRISPR-Cas9-based acetyltransferase activates genes from promoters and enhancers. *Nat. Biotechnol.* **33**(5): 510-517.
- Hu J.H., S.M. Miller, M.H. Geurts, W. Tang, L. Chen, N. Sun, *et al.* (2018) Evolved Cas9 variants with broad PAM compatibility and high DNA specificity. *Nature* **556**(7699): 57-63.
- Humbert O., S. Radtke, C. Samuelson, R.R. Carrillo, A.M. Perez, S.S. Reddy, *et al.* (2019) Therapeutically relevant engraftment of a CRISPR-Cas9–edited HSC-enriched population with HbF reactivation in nonhuman primates. *Science Translational Medicine* **11**(503): eaaw3768.
- Jinek M., K. Chylinski, I. Fonfara, M. Hauer, J.A. Doudna & E. Charpentier (2012) A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* **337**(6096): 816-821.
- Kim E., T. Koo, S.W. Park, D. Kim, K. Kim, H.Y. Cho, *et al.* (2017) In vivo genome editing with a small Cas9 orthologue derived from *Campylobacter jejuni*. *Nat. Commun.* **8**: 14500.
- Kim J. S. (2018) Precision genome engineering through adenine and cytosine base editing. *Nat. Plants* **4**(3): 148-151.
- Kleinstiver B.P., A.A. Sousa, R.T. Walton, Y.E. Tak, J.Y. Hsu, K. Clement, *et al.* (2019) Engineered CRISPR–Cas12a variants with increased activities and improved targeting ranges for gene, epigenetic and base editing. *Nature Biotechnology* **37**(3): 276-282.
- Koike-Yusa H., Y. Li, E.P. Tan, C. Velasco-Herrera & K. Yusa (2014) Genome-wide recessive genetic screening in mammalian cells with a lentiviral CRISPR-guide RNA library. *Nat. Biotechnol.* **32**(3): 267-273.
- Komor A.C., Y.B. Kim, M.S. Packer, J.A. Zuris & D.R. Liu (2016) Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature* **533**(7603): 420-424.
- Kuehn M. R., A. Bradley, E. J. Robertson & M. J. Evans (1987) A potential animal model for Lesch–Nyhan syndrome through introduction of HPRT mutations into mice. *Nature* **326**(6110): 295-298.
- Lander E.S., F. Baylis, F. Zhang, E. Charpentier, P. Berg, C. Bourgain, *et al.* (2019) Adopt a moratorium on heritable genome editing. *Nature* **567**(7747): 165-168.
- Lander E. S., L. M. Linton, B. Birren, C. Nusbaum, M. C. Zody, J. Baldwin, *et al.* (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409**(6822): 860-921.
- Li B., Y. Niu, W. & Y. Dong (2020) Strategies for the CRISPR-Based Therapeutics. *Trends Pharmacol. Sci.* **41**(1): 55-65.
- Li H.L., N. Fujimoto, N. Sasakawa, S. Shirai, T. Ohkame, T. Sakuma, *et al.* (2015) Precise correction of the dystrophin gene in duchenne muscular dystrophy patient induced pluripotent stem cells by TALEN and CRISPR-Cas9. *Stem Cell Reports* **4**(1): 143-154.
- Liang P., C. Ding, H. Sun, X. Xie, Y. Xu, X. Zhang, *et al.* (2017) Correction of beta-thalassemia mutant by base editor in human embryos. *Protein Cell* **8**(11): 811-822.
- Lin Y., T.J. Cradick, M.T. Brown, H. Deshmukh, P. Ranjan, N. Sarode, *et al.* (2014) CRISPR/Cas9 systems have off-target activity with insertions or deletions between target DNA and guide RNA sequences. *Nucleic Acids Res.* **42**(11): 7473-7485.
- Long C., J. R. McAnally, J. M. Shelton, A. A. Mireault, R. Bassel-Duby & E. N. Olson (2014) Prevention of muscular dystrophy in mice by CRISPR/Cas9-mediated editing of germline DNA. *Science* **345**(6201): 1184-1188.
- Lu Y. & J.K. Zhu (2017) Precise Editing of a Target Base in the Rice Genome Using a Modified CRISPR/Cas9 System. *Mol. Plant* **10**(3): 523-525.
- Maeder M.L., S.J. Linder, V.M. Cascio, Y. Fu, Q.H. Ho & J.K. Joung (2013) CRISPR RNA-guided activation of endogenous human genes. *Nat. Methods* **10**(10): 977-979.
- McManus M.T. & P.A. Sharp (2002) Gene silencing in mammals by small interfering RNAs. *Nat. Rev. Genet.* **3**(10): 737-747.
- Mohanraju P., K.S. Makarova, B. Zetsche, F. Zhang, E.V. Koonin & J. van der Oost (2016) Diverse evolutionary roots and mechanistic variations of the CRISPR-Cas systems. *Science* **353**(6299): aad5147.

- Naso M.F., B. Tomkowicz, W.L. Perry III & W.R. Strohl (2017) Adeno-Associated Virus (AAV) as a Vector for Gene Therapy. *BioDrugs* **31**(4): 317-334.
- Nelson C.E., Y. Wu, M.P. Gemberling, M.L. Oliver, M.A. Waller, J.D. Bohning, *et al.* (2019) Long-term evaluation of AAV-CRISPR genome editing for Duchenne muscular dystrophy. *Nat. Med.* **25**(3): 427-432.
- Nishida K., T. Arazoe, N. Yachie, S. Banno, M. Kakimoto, M. Tabata, *et al.* (2016) Targeted nucleotide editing using hybrid prokaryotic and vertebrate adaptive immune systems. *Science* **353**(6305).
- Nobelprize.org (2007). The Nobel Prize in Physiology or Medicine for 2007. <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2007/press-release/>. Consultada en junio de 2020.
- Park S.H., C.M. Lee, D.P. Dever, T.H. Davis, J. Camarena, W. Srifa, *et al.* (2019) Highly efficient editing of the β -globin gene in patient-derived hematopoietic stem and progenitor cells to treat sickle cell disease. *Nucleic Acids Research* **47**(15): 7955-7972.
- Pickar-Oliver A. & C.A. Gersbach (2019) The next generation of CRISPR–Cas technologies and applications. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **20**(8): 490-507.
- Qi L.S., M.H. Larson, L.A. Gilbert, J.A. Doudna, J.S. Weissman, A.P. Arkin, *et al.* (2013) Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. *Cell* **152**(5): 1173-1183.
- Ran F.A., P.D. Hsu, C.Y. Lin, J.S. Gootenberg, S. Konermann, A.E. Trevino, *et al.* (2013) Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell* **154**(6): 1380-1389.
- Rees H.A., A.C. Komor, W.H. Yeh, J. Caetano-Lopes, M. Warman, A.S.B. Edge, *et al.* (2017) Improving the DNA specificity and applicability of base editing through protein engineering and protein delivery. *Nat. Commun.* **8**: 15790.
- Rodino-Klapac L. R., L. G. Chicoine, B. K. Kaspar & J. R. Mendell (2007) Gene therapy for duchenne muscular dystrophy: expectations and challenges. *Arch. Neurol.* **64**(9): 1236-1241.
- Sadigh-Eteghad S., M. Talebi & M. Farhoudi (2012) Association of apolipoprotein E epsilon 4 allele with sporadic late onset Alzheimer`s disease. A meta-analysis. *Neurosciences (Riyadh)* **17**(4): 321-326.
- Sanger F., G. M. Air, B. G. Barrell, N. L. Brown, A. R. Coulson, C. A. Fiddes, *et al.* (1977) Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. *Nature* **265**(5596): 687-695.
- Sanjana N.E., O. Shalem & F. Zhang (2014) Improved vectors and genome-wide libraries for CRISPR screening. *Nat. Methods* **11**(8): 783-784.
- Scherer S. & R. W. Davis (1979) Replacement of chromosome segments with altered DNA sequences constructed in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **76**(10): 4951-4955.
- Schwank G., B. K. Koo, V. Sasselli, J. F. Dekkers, I. Heo, T. Demircan, *et al.* (2013) Functional repair of CFTR by CRISPR/Cas9 in intestinal stem cell organoids of cystic fibrosis patients. *Cell. Stem. Cell* **13**(6): 653-658.
- Scudellari M. (2019) Self-destructing mosquitoes and sterilized rodents: the promise of gene drives. *Nature* **571**(7764): 160-162.
- Shalem O., N.E. Sanjana, E. Hartenian, X. Shi, D.A. Scott, T. Mikkelsen, *et al.* (2014) Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells. *Science* **343**(6166): 84-87.
- Shalem O., N.E. Sanjana & F. Zhang (2015) High-throughput functional genomics using CRISPR-Cas9. *Nat. Rev. Genet.* **16**(5): 299-311.
- Shimatani Z., S. Kashojiya, M. Takayama, R. Terada, T. Arazoe, H. Ishii, *et al.* (2017) Targeted base editing in rice and tomato using a CRISPR-Cas9 cytidine deaminase fusion. *Nat. Biotechnol.* **35**(5): 441-443.
- Smithies O., R. G. Gregg, S. S. Boggs, M. A. Koralewski & R. S. Kucherlapati (1985) Insertion of DNA sequences into the human chromosomal β -globin locus by homologous recombination. *Nature* **317**(6034): 230-234.
- Szybalska E.H. & W. Szybalski (1962) Genetics of human cell line. IV. DNA-mediated heritable transformation of a biochemical trait. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **48**(12): 2026-2034.
- Tan J., F. Zhang, D. Karcher & R. Bock (2020) Expanding the genome-targeting scope and the site selectivity of high-precision base editors. *Nat. Commun.* **11**(1): 629.
- Thakore P.I., A.M. D'Ippolito, L. Song, A. Safi, N.K. Shivakumar, A.M. Kabadi, *et al.* (2015) Highly specific epigenome editing by CRISPR-Cas9 repressors for silencing of distal regulatory elements. *Nat. Methods* **12**(12): 1143-1149.

- Thomas K.R., K.R. Folger & M. R. Capecchi (1986) Hifrequency targeting of genes to specific sites in the mammalian genome. *Cell* **44**(3): 419-428.
- Urnov F.D., E.J. Rebar, M.C. Holmes, H.S. Zhang & P.D. Gregory (2010) Genome editing with engineered zinc finger nucleases. *Nat. Rev. Genet.* **11**(9): 636-646.
- Virreira Winter S., A. Zychlinsky & B.W. Bardoel (2016) Genome-wide CRISPR screen reveals novel host factors required for Staphylococcus aureus alpha-hemolysin-mediated toxicity. *Sci. Rep.* **6**: 24242.
- Wan T., D. Niu, C. Wu, F.J. Xu, G. Church & Y. Ping (2019) Material solutions for delivery of CRISPR/Cas-based genome editing tools: Current status and future outlook. *Materials Today* **26**: 40-66.
- Wang D., P.W.L. Tai & G. Gao (2019) Adeno-associated virus vector as a platform for gene therapy delivery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **18**(5): 358-378.
- Wang T., J.J. Wei, D.M. Sabatini & E.S. Lander (2014) Genetic screens in human cells using the CRISPR-Cas9 system. *Science* **343**(6166): 80-84.
- Watson J.D. & F.H. Crick (1953) Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* **171**(4356): 737-738.
- Wolinetz C.D. & F.S. Collins (2019) NIH supports call for moratorium on clinical uses of germline gene editing. *Nature* **567**(7747): 175.
- Wu Y., J. Zeng, B.P. Roscoe, P. Liu, Q. Yao, C.R. Lazzarotto, *et al.* (2019) Highly efficient therapeutic gene editing of human hematopoietic stem cells. *Nat. Med.* **25**(5): 776-783.
- Xu L., H. Yang, Y. Gao, Z. Chen, L. Xie, Y. Liu, *et al.* (2017) CRISPR/Cas9-Mediated CCR5 Ablation in Human Hematopoietic Stem/Progenitor Cells Confers HIV-1 Resistance In Vivo. *Mol. Ther.* **25**(8): 1782-1789.
- Yan W.X., P. Hunnewell, L.E. Alfonse, J.M. Carte, E. Keston-Smith, S. Sothiselvam, *et al.* (2019) Functionally diverse type V CRISPR-Cas systems. *Science* **363**(6422): 88-91.
- Yin H., K.J. Kauffman & D.G. Anderson (2017) Delivery technologies for genome editing. *Nature Reviews Drug Discovery* **16**(6): 387-399.
- Zhang R., J. Liu, Z. Chai, S. Chen, Y. Bai, Y. Zong, *et al.* (2019) Generation of herbicide tolerance traits and a new selectable marker in wheat using base editing. *Nat. Plants* **5**(5): 480-485.
- Zhou Y., S. Zhu, C. Cai, P. Yuan, C. Li, Y. Huang, *et al.* (2014) High-throughput screening of a CRISPR/Cas9 library for functional genomics in human cells. *Nature* **509**(7501): 487-491.