



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**SISTEMAS CRISPR/CAS:
LAS TIJERAS DEL GENOMA**

TESINA

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A

MARCO ANTONIO CASTILLO SÁNCHEZ



CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor:** PEDROZA GARCÍA JOSÉ ANTONIO

VOCAL: **Profesora:** SÁNCHEZ NIETO SOBEIDA

SECRETARIA: **Profesora:** DÍAZ VILCHIS ADELAIDA

1er. SUPLENTE: **Profesora:** RODRÍGUEZ PENAGOS MIREYA

2º SUPLENTE: **Profesor:** RODRÍGUEZ SOTRES ROGELIO

ASESOR DEL TEMA:

PEDROZA GARCÍA JOSÉ ANTONIO

SUSTENTANTE:

CASTILLO SÁNCHEZ MARCO ANTONIO

*Poor is the man
whose pleasures depend
on the permission of another*
Madonna, 1992

RECONOCIMIENTOS

Este trabajo se llevó a cabo gracias al proyecto PAPIME P202023, UNAM y PAIP 5000-911, Facultad de Química, UNAM.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	6
ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS	8
RESUMEN	9
1. INTRODUCCIÓN	11
2. OBJETIVOS	16
3. OBJETIVOS PARTICULARES	16
4. SISTEMA CRISPR/CAS	17
4.1. GENERALIDADES	17
4.2. DESCUBRIMIENTO DEL SISTEMA CRISPR/CAS	19
4.3. SISTEMA INMUNE ADAPTATIVO NATURAL DE LAS BACTERIAS CONTRA BACTERIÓFAGOS	22
4.4. COMPONENTES DEL SISTEMA CRISPR/CAS	25
5. DESARROLLO DEL SISTEMA CRISPR/CAS9 PARA LA EDICIÓN GENÓMICA	27
5.1. COMPONENTES	27
5.2. IMPORTANCIA DEL DISEÑO DE LOS RNA GUÍAS	31
5.3. ENFOQUES MÁS UTILIZADOS DEL SISTEMA CRISPR/CAS9 EN EL LABORATORIO	32
5.4. MÚLTIPLES APLICACIONES DEL SISTEMA CRISPR/CAS9	35
6. VARIANTES DEL SISTEMA CRISPR/CAS	44
6.1. CRISPR/CAS12	44
6.2. CRISPR/CAS13	47
6.3. MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO BASADOS EN LA TECNOLOGÍA CRISPR/CAS	49
6.4. FUNCIONES DEL SISTEMA CRISPR/CAS9 SIN ACTIVIDAD DE ENDONUCLEASA	53
6.5. OTRAS VARIANTES DEL SISTEMA CRISPR/CAS	55
7. CONCLUSIONES	57
8. REFERENCIAS	58

ABREVIATURAS

Cas. Crispr Associated proteins, Proteínas asociadas a CRISPR

CRISPR. Clustered Repeat Interspaced Palindromic Repeats, repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas

crRNA. RNA CRISPR

dCas9. Deactivated Cas9, Cas9 inactiva

ELA. Esclerosis Lateral Amiotrófica

FDA. Food and Drug Administration, Administración de Alimentos y Sustancias

gRNA. RNA guía

HDR. Homology-Directed Repair, reparación dirigida por homología

ITS. Infección de Transmisión Sexual

LCA. Amaurosis congénita de Leber

miRNA. microRNA

MITI. Microhomology-dependent targeted integrations, integraciones dirigidas dependientes de microhomología

mRNA. Messenger RNA, RNA mensajero

NHEJ. Nonhomologous end joining, unión de extremos no homólogos

nt. Nucleótidos

OMS. Organización Mundial de la Salud

PAM. Protospacer Adjacent Motif, motivo adyacente de protoespaciador

PFS. Protospacer Flanking Sequence, Secuencia flanqueante del protoespaciador

PCR. Polymerase Chain Reaction, reacción en cadena de la polimerasa

qPCR. PCR cuantitativa

RNP. Ribonucleoproteína

RPA. Recombinase Polymerase Amplification, Amplificación mediada por recombinasa y polimerasa

sgRNA. Single guide RNA, RNA guía único

TALEN. Transcription activator-like effector nuclease, nucleasa de actividad similar a activador de transcripción

tracrRNA. Trans-activating crRNA, RNA CRISPR transactivante

VIH. Virus de Inmunodeficiencia Humana

VPH. Virus del Papiloma Humano

ZFN. Zinc Finger Nuclease, nucleasa con dedos de zinc

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

<i>Figura 1. Esquema general del funcionamiento de CRISPR para evitar la infección viral</i>	18
<i>Figura 2. Línea del tiempo de los descubrimientos de CRISPR-Cas</i>	21
<i>Figura 3. Sistema inmune adaptativo en bacterias</i>	24
<i>Figura 4. Clasificación de los sistemas CRISPR-Cas</i>	26
<i>Figura 5. Complejo CRISPR-Cas9</i>	27
<i>Figura 6. Mecanismos de reparación de la ruptura de la doble cadena</i>	30
<i>Figura 7. Detección de secuencias usando Cas 12</i>	45
<i>Figura 8. Detección de ácidos nucleicos utilizando CRISPR-Cas</i>	52
<i>Figura 9. Regulación transcripcional usando dCas</i>	54
<i>Tabla 1. Resumen de las aplicaciones utilizando CRISPR/Cas9</i>	43
<i>Tabla 2. Resumen de las diferencias y similitudes de los sistemas CRISPR/Cas</i>	48

RESUMEN

En la última década los avances en el campo de la Bioquímica y la Biología Molecular han dado paso al surgimiento de una nueva disciplina denominada Biología Sintética, cuyo estudio involucra la aplicación de los principios básicos de la ingeniería en el área biológica con el fin de (re)diseñar y fabricar componentes y sistemas biológicos no existentes en la naturaleza. La Biología sintética contribuye al avance de diversas áreas de investigación desde la biología básica hasta la biomanufactura de materiales y el desarrollo de nuevos tratamientos para combatir enfermedades. El advenimiento de nuevas tecnologías moleculares, tales como la implementación de la tecnología de edición genómica por CRISPR/Cas, ha hecho que desde el año 2012 esta disciplina esté tomando relevancia y un crecimiento acelerado dentro de la investigación biológica. Debido a que la tecnología CRISPR/Cas se basa en el sistema de defensa utilizado por algunas bacterias para responder a la infección contra bacteriófagos, los componentes de este sistema tales como la endonucleasa Cas, pueden ser reconfigurados direccionando su actividad catalítica al sitio de corte deseado en el genoma a partir del diseño *ad doc* de un RNA guía complementario al sitio blanco. Por tanto, el sistema CRISPR-Cas puede ser utilizado para cortar, silenciar, sustituir o insertar genes, por lo que su campo de aplicación se extiende ampliamente: desde el diagnóstico de enfermedades simples como alguna infección viral

hasta usos complejos como el desarrollo de agentes terapéuticos para el cáncer. La aparición de este novedoso sistema de edición genómica ha dado lugar al desarrollo de diferentes enfoques para su implementación en los laboratorios de investigación y en consecuencia, a un aumento en la información experimental contenida en diferentes bases de datos. Lo anterior ha ayudado a refinar los algoritmos necesarios para el diseño eficaz de RNA guías de diferentes organismos, ya sea para su uso en el sistema clásico que emplea Cas9 o para las variantes de este sistema que utilizan la nucleasas Cas12 o Cas13, incluidas sus versiones inactivas.

En este trabajo se revisan las diferentes técnicas de CRISPR/Cas para entender cómo funcionan y cuál es el alcance de su uso molecular en diferentes campos de aplicación.

1. INTRODUCCIÓN

En las últimas 5 décadas se confirmó que un gran número de enfermedades están asociadas a la herencia, debido a cambios en las secuencias de un gen determinado. Por lo tanto, la idea de modificar con precisión el DNA alterado para recuperar la versión silvestre y funcional del gen se postuló como el tratamiento idóneo para la cura de estas enfermedades mediante la terapia génica. Sin embargo, para lograr esto se necesitaría un método que pudiera realizar modificaciones en el DNA del cromosoma o que permitiera insertar nueva información genética en la célula. No fue hasta la aparición de la ingeniería genética que se abriría la posibilidad de comenzar a manipular el material genético, aunque no con la precisión requerida. En 1973, con la aparición del primer plásmido generado en el laboratorio y utilizado como vector de clonación se logró introducir nueva información genética a un organismo diferente pero únicamente de manera extracromosomal (Cohen, 2013). En 1974 se creó el primer animal genéticamente modificado (Jaenisch & Mintzt, 1974); mientras en 1983 se generó la primera planta de tabaco transgénica la cual presentó resistencia al antibiótico G418, también conocido como Geneticina (Bevan et al., 1983). Durante las últimas dos décadas del siglo XX se mejoraron las técnicas de ingeniería genética permitiendo la generación de múltiples organismos modificados genéticamente (OGMs), los cuales se utilizaron con fines

de investigación y comerciales. No obstante, aún no se lograba hacer una modificación genética con total precisión.

En los siguientes 10 años se obtuvieron avances revolucionarios en el área de la manipulación genética. Por ejemplo, en 1997 el Instituto Roslin dio a conocer a la oveja Dolly, el primer mamífero producto de una clonación de un individuo animal a partir de células somáticas (The University of Edinburgh, 2017). Un año más tarde, Andrew Fire y Craig Mello publicaron un hallazgo que los hizo merecedores del Premio Nobel en 2006: el RNA de interferencia, un mecanismo para silenciar la expresión de genes específicos a través de la degradación de mRNA con lo que se permitía controlar la expresión génica (Comunicado de Prensa de los Premio Nobel, 2006).

Por lo tanto, los avances obtenidos hasta la primera década del siglo XXI acerca de la manipulación genética permitieron generar organismos transgénicos con nuevas características, entre ellos plantas transgénicas resistentes a plagas y/o condiciones adversas al ambiente; cepas de hongos y bacterias modificadas genéticamente para la sobreproducción de metabolitos secundarios de interés industrial; obtención de proteínas recombinantes de humano en bacteria como en el caso de la insulina y el factor de crecimiento. A pesar de todos estos avances, las herramientas existentes para la manipulación genética todavía mostraban muchas limitantes sobre

todo en la modificación precisa del genoma. En el caso de plantas y cepas de hongos y bacterias se utilizaron estrategias de mutagénesis al azar y se seleccionaban los individuos con las características fenotípicas deseadas, en la mayoría de los casos no se conocía que gen había sido mutado. Posteriormente, la generación de organismos transgénicos permitió tener un mayor control en la manipulación genética otorgando un nuevo gen a un organismo para conferir una característica fenotípica deseada, sin embargo, muchas veces no se conocía en qué región del genoma estaba insertado el DNA de la construcción, por lo que se desconocía si se afectaban otros genes de ese genoma. Estas mutaciones e inserciones de DNA aleatoriamente sobre el genoma podrían tener consecuencias no deseadas. Por lo tanto, aún quedaba un gran reto que resolver **¿Cómo realizar una modificación en el genoma que sea dirigida a un lugar preciso?**

Con el nacimiento de la biología sintética surgieron nuevas técnicas de edición del genoma como lo son el uso de nucleasas con dedos de zinc, que permiten cortar la doble cadena de DNA para promover una reparación endógena; o los TALEN (en español, nucleasa similar al activador de transcripción) que son enzimas de restricción que reconocen y cortan una secuencia específica de DNA (Shamshirgaran et al., 2022). Sin embargo, al utilizar el método de TALENs se requieren de procesos complejos de ingeniería de proteínas para

lograr el reconocimiento de la secuencia lo que complica su uso (Kim & Kim, 2014). Por otra parte, el uso de ZFN se limita a secuencias pequeñas, pues su principal desventaja es que no es sencillo ensamblar secuencias largas con un alto nivel de afinidad (Gupta & Musunuru, 2014).

En 2013 se publicó el sistema CRISPR/Cas (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats, en español, repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas/CRISPR associated proteins, en español, proteínas asociadas a CRISPR) como una herramienta de la biología sintética para lograr la edición de genomas eucariotas de manera específica y precisa (Qi et al., 2013).

El sistema CRISPR/Cas se encuentra de manera natural en bacterias y arqueas para poder hacer frente a los bacteriófagos, virus que infectan a estos microorganismos. Este método puede resumirse en tres pasos simples: 1) el material genético invasor es incorporado a la secuencia del cromosoma; 2) se transcriben los genes CRISPR para formar un complejo que incluye la secuencia guía homóloga al invasor así como la enzima Cas que participará en la degradación de la secuencia blanco a través de la actividad de endonucleasa y 3) las secuencias de ácidos nucleicos del bacteriófago son reconocidas y degradadas deteniendo el proceso infeccioso (Manghwar et al., 2019).

Este mecanismo ha sido adaptado para ser utilizado en la edición de genomas de múltiples organismos, incluyendo células humanas (Doudna & Charpentier, 2014). En la última década esta técnica ha revolucionado la manipulación del material genético ya que permite modificar de manera precisa una región del DNA de interés. Entre sus aplicaciones están la modificación de cultivos de interés agrícola (Kalinina et al., 2020), microorganismos productores de metabolitos secundarios (Jiang et al., 2021), realización de pruebas diagnósticas para algunos patógenos (Kaminski et al., 2021) y comienza a tener aplicaciones en la prevención y cura de enfermedades genéticas (Chavez et al., 2023). A pesar de todos estos avances aún quedan varios retos que resolver para su utilización efectiva en el tratamiento de enfermedades, entre los que se encuentran: ¿cómo modificar millones de células de manera efectiva?; ¿cómo estar seguros de que no modificaremos otra región del genoma y no solo la secuencia blanco?; ¿Qué aspectos éticos y humanistas deben ser considerados para el uso de esta técnica en humanos?

La finalidad de este trabajo no es responder a estas preguntas, sino ofrecer una revisión actualizada con información consolidada relacionada a los fundamentos de la técnica y de los múltiples usos de los sistemas CRISPR/Cas.

2. OBJETIVOS

- Conocer el avance histórico de los sistemas CRISPR/Cas y sus múltiples aplicaciones
- Realizar una investigación estructural y comparativa de los sistemas CRISPR/Cas

3. OBJETIVOS PARTICULARES

- Describir las tecnologías de edición genómica basadas en los sistemas de CRISPR/Cas
- Describir las múltiples variantes de las tecnologías de CRISPR/Cas y sus aplicaciones
- Establecer la importancia de los sistemas CRISPR/Cas en la nueva era biotecnológica

4. SISTEMA CRISPR/CAS

4.1. GENERALIDADES

El sistema CRISPR-Cas es un sistema inmune adaptativo que se encuentra en la mayoría de las bacterias y arqueas. CRISPR se compone de secuencias repetidas idénticas que están separadas por distintos fragmentos de DNA, la particularidad de estos espaciadores es que son complementarios a secuencias de fagos o plásmidos invasores (Ishino et al., 2018), esto con la finalidad de poder crear un RNA guía que sea capaz de localizar y unirse al DNA del invasor por complementariedad. Los genes *Cas* (en español: asociados a CRISPR) que también se encuentran cerca de la región CRISPR son la segunda parte del sistema, pues estos genes codifican enzimas que permiten cortar y pegar las secuencias de DNA (Jinek et al., 2012). El RNA guía formará un complejo con la endonucleasa Cas para encontrar su secuencia blanco y cortarla. En la Figura 1 se muestra un esquema muy general de cómo funciona este sistema dentro de la célula procariota.

De las diferentes variaciones que existen del sistema, CRISPR-Cas9 es probablemente la más reconocida y descrita. En 2020, Jennifer Doudna (EE. UU) y Emmanuelle Charpentier (Francia) obtuvieron el Premio Nobel de Química por haber producido una versión mejorada del sistema, al lograr que Cas9 tuviera solo dos componentes en lugar

de 4, de tal manera que los esfuerzos por diseñar un RNA guía fueran menores. Al reducir el número de componentes se hizo posible crear un sistema *artificial* que pudiera ser utilizado en múltiples organismos incluyendo las células de humanos (Jinek et al., 2012).

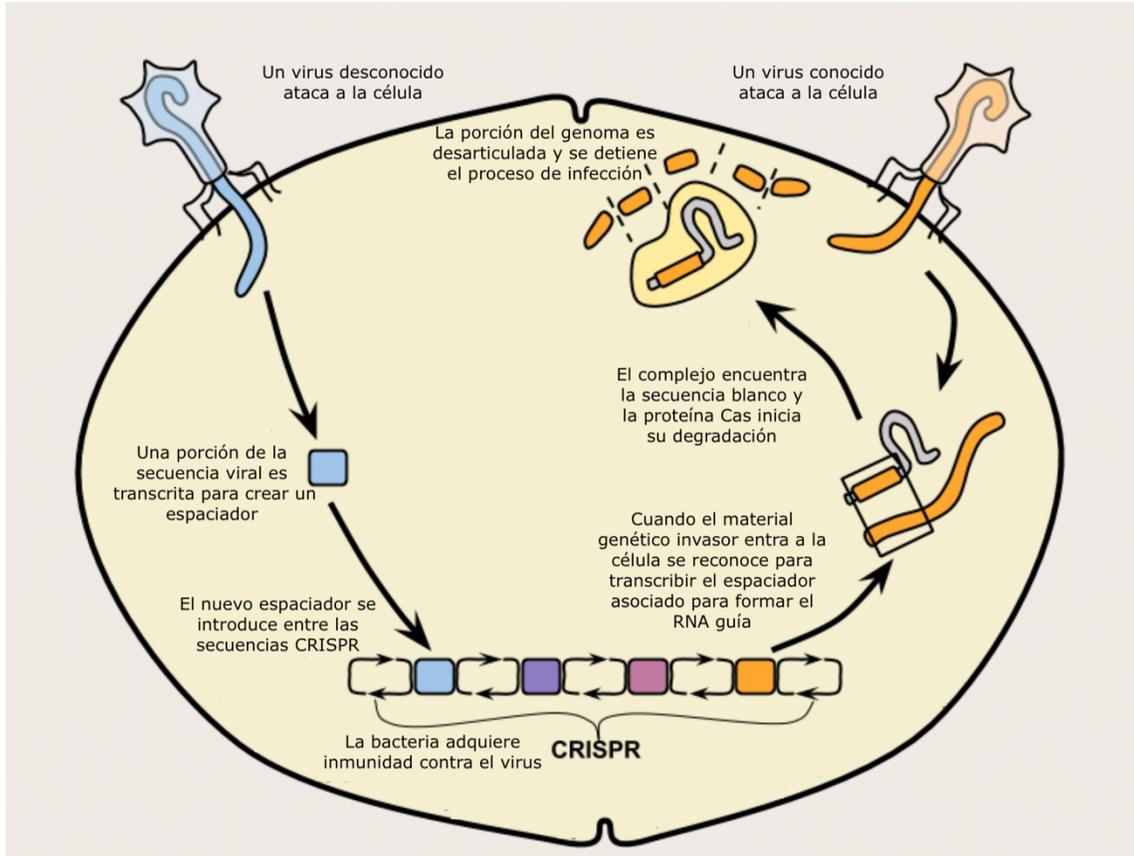


Figura 1. Esquema general del funcionamiento de CRISPR para evitar la infección viral. El material genético invasor es reconocido y se transcribe en un espaciador para que en una infección posterior sea usado como guía complementaria para detener la infección. Adaptado y traducido de Howell-Moroney, 2022.

4.2. DESCUBRIMIENTO DEL SISTEMA CRISPR/CAS

Los primeros esbozos de CRISPR se remontan a 1987, cuando científicos de la Universidad de Osaka, Japón estudiaban el gen *iap*, responsable de codificar a la enzima fosfatasa alcalina en *Escherichia coli*, y se percataron de la presencia de algo particularmente inusual: había cinco secuencias homólogas de 29 nucleótidos que estaban dispuestas a lo largo del extremo 3' del gen *iap* acomodadas en repeticiones que incluían espaciadores de 32 nucleótidos (Ishino *et al.*, 1987). Sin embargo, las estrategias existentes en esa época no permitieron estudiar la importancia de este tipo de elementos en el genoma. No fue hasta seis años después que se mostró que la arquea *Haloferax mediterranei* poseía en su genoma secuencias cortas, palindrómicas y repetidas (Mojica *et al.*, 1993). Fue sólo cuestión de tiempo para que también se confirmara la presencia de estas secuencias en varios genomas de otras bacterias y arqueas. Si bien su función biológica no fue descrita inicialmente, el hecho de que se encontraran estas secuencias en dos de los tres dominios de la vida apuntaba a que tenía una relevancia clave para el desarrollo de estos microorganismos (Ishino *et al.*, 2018).

Los términos *CRISPR* y *Cas* aparecieron por primera vez en Jansen *et al.*, 2002, en este trabajo se describieron las características básicas de la disposición de los elementos que componen al sistema de

inmunidad de bacterias y arqueas, tales como la longitud de las repeticiones palindrómicas, así como los componentes río abajo y río arriba.

Con estos avances se comenzó a comprender la funcionalidad del sistema, sin embargo, no fue hasta que se descubrieron los espaciadores que se entendió su funcionalidad por completo. Bolotin *et al* (2005) descubrieron que los espaciadores tenían un origen extracromosomal y que estas secuencias tenían principalmente homología con secuencias de los genomas de algunos bacteriófagos. Esta nueva característica hizo que el mismo grupo de científicos propusiera que las secuencias funcionaban como una respuesta inmune al ser rastro de infecciones pasadas, un mecanismo similar a como sucede en eucariontes. En la Figura 2 se resumen los principales acontecimientos históricos que permitieron la descripción de la función del sistema CRISPR/Cas9 hasta su adaptación para la edición de genomas en eucariotas y la aparición de las variantes Cas12 y Cas13 cuya importancia se describe en próximas secciones.



Figura 2. Línea del tiempo con los acontecimientos más importantes del descubrimiento de CRISPR-Cas. Autoría propia.

4.3. SISTEMA INMUNE ADAPTATIVO NATURAL DE LAS BACTERIAS CONTRA BACTERIÓFAGOS

Los humanos nos enfrentamos a agentes infecciosos todos los días, y es nuestro sistema inmune quien se encarga de hacer memoria para responder a una reinfección de microorganismos patógenos incluyendo virus los cuales son pequeñas partículas infecciosas que necesitan de la maquinaria de un ser vivo para replicarse. De igual forma las bacterias y arqueas son infectadas por virus los cuales son llamados bacteriófagos (Baker et al., 2020). Considerando que los animales montamos una respuesta inmune haciendo uso de millones de células ¿cómo puede un organismo unicelular protegerse contra estos agentes infecciosos? La respuesta está en uno de los descubrimientos científicos más importantes de los últimos años: el sistema CRISPR/Cas, el cual actúa como su sistema inmune adaptativo.

El mecanismo de defensa suele dividirse en tres etapas: 1) adaptación, 2) procesamiento e 3) Interferencia (Mosterd et al., 2021). El primer paso comprende el corte del material genético invasor para su posterior incorporación como espaciador. Esto es posible gracias a múltiples proteínas Cas que funcionan como nucleasas. Una vez insertado, esta secuencia funcionará para producir un RNA guía necesario en el siguiente paso, el procesamiento (Newsom et al., 2021). El crRNA (RNA CRISPR) se transcribe en una

cadena larga que posteriormente, con la ayuda de proteínas *Cas*, madura para poder convertirse en una cadena funcional (Silas et al., 2016) . En el proceso de interferencia, el crRNA tiene la capacidad de reconocer al material genético invasor. Si bien esta secuencia representa una infección pasada, el crRNA no es capaz de realizar acción por sí solo, así que guía a las proteínas indicadas para hacer el corte (Silas et al., 2016). La Figura 3 ilustra cada uno de los pasos descritos acerca del mecanismo funcional del sistema CRISPR/Cas en procariotas. Hasta la fecha, el sistema CRISPR/Cas es el único sistema inmune adaptativo del que se tiene registro en bacterias y arqueas.

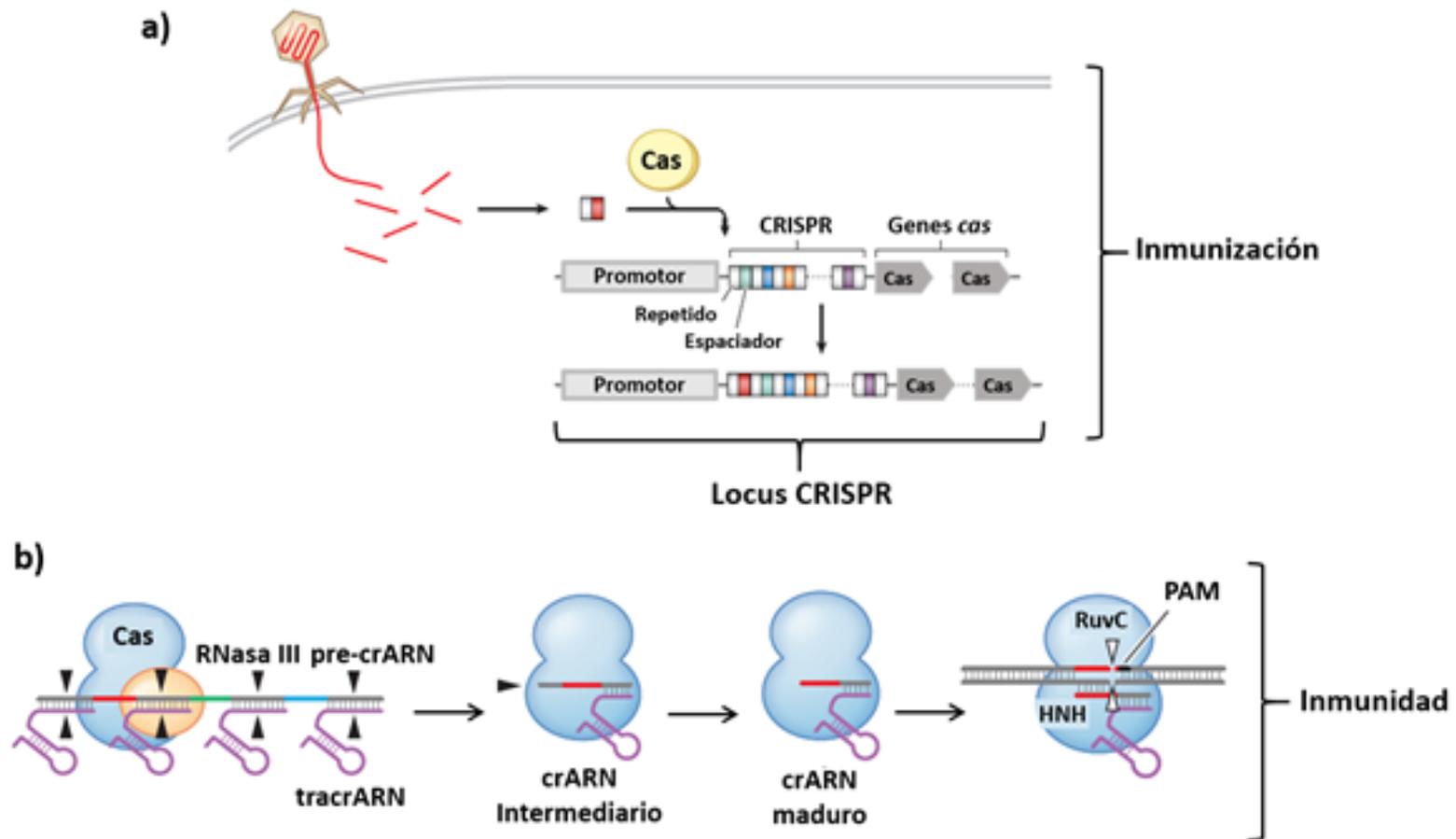


Figura 3. Sistema inmune adaptativo en bacterias. a) adaptación: incorporación de la secuencia invasora al locus CRISPR; b) procesamiento: el crRNA madura para crear el complejo, interferencia: el complejo está listo para reconocer y degradar la secuencia invasora. RuvC corta la secuencia no invasora y HNH corta el blanco molecular. Tomado y Adaptado de Chávez-Jacobo, 2018.

4.4. COMPONENTES DEL SISTEMA CRISPR/CAS

La primera gran clasificación de los sistemas CRISPR/Cas se basa en el número de componentes de los genes *Cas* involucrados para el procesamiento e interferencia del crRNA. La Clase I tiene múltiples componentes que en su conjunto poseen todas las actividades necesarias para el correcto funcionamiento del complejo. Por otra parte, los sistemas de la Clase II contienen únicamente una secuencia *Cas*, como es el caso de CRISPR/Cas9, para el tratamiento del crRNA (Silas et al., 2016).

Principalmente son las proteínas Cas1 y Cas2 quienes se encargan de la adaptación, es decir, de crear los espaciadores cuando el material genético entra por primera vez a la bacteria (Xu & Li, 2020). Cuando la infección vuelva a ocurrir, el complejo Cas que contiene proteínas que cortan a la secuencia invasora será transcrito para posteriormente unirse al crRNA que contiene las secuencias espaciadoras (Gaj et al., 2016).

El crRNA está asociado a su vez con el tcrRNA (RNA trans-activante) que le da soporte y estructura para poder ser transportado al blanco molecular. Estos dos componentes forman el gRNA (RNA guía), que pertenece a la parte CRISPR, y de acuerdo con la Clase que estemos estudiando, este gRNA estará asociado con una o más proteínas Cas, formando así el sistema CRISPR/Cas. En la Figura 4 se muestra cómo

pueden clasificarse los sistemas CRISPR/Cas de acuerdo con sus componentes.

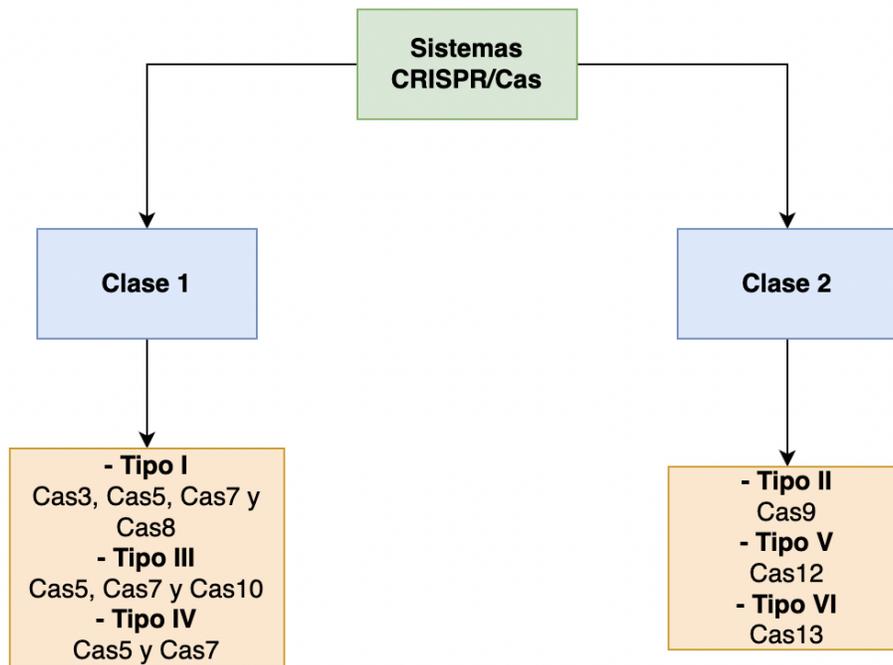


Figura 4. Clasificación de los sistemas CRISPR/Cas. Los sistemas de Clase 1 necesitan de más de una proteína Cas para el proceso de interferencia a diferencia de la Clase 2 que sólo requiere de una. Autoría propia.

En los sistemas de Clase 1 intervienen múltiples proteínas Cas para el proceso de interferencia, dentro de estos se encuentran los tipos I, III y IV (Figura 4). Por otra parte, los sistemas de Clase 2 utilizan solamente una proteína Cas siendo los tipos II, V y VI (Figura 4). Por lo tanto, cuando se adaptó el sistema para que su uso fuera como de los procariontes se eligió un sistema de pocos componentes (Wang

et al., 2020). Es por esta razón que en la actualidad CRISPR/Cas9 es la versión más estudiada y utilizada dentro del campo de la ingeniería genética.

5. DESARROLLO DEL SISTEMA CRISPR/CAS9 PARA LA EDICIÓN GENÓMICA

5.1. COMPONENTES

Al pertenecer a la Clase 2, el sistema CRISPR/Cas9 necesita únicamente de dos componentes generales: el gRNA y Cas9 (Figura 5).

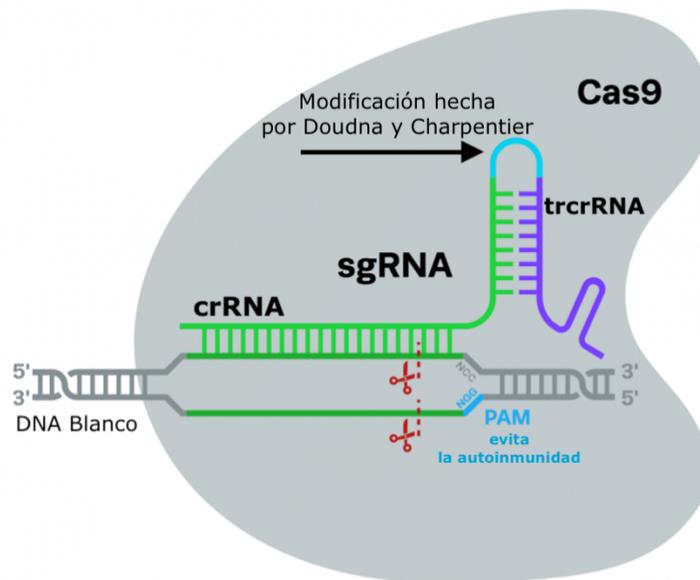


Figura 5. Complejo CRISPR/Cas9. Indicado con una flecha se muestra la modificación realizada por Doudna y Charpentier para formar una quimera uniendo crRNA con el tracrRNA. Dentro de la bacteria estos dos elementos no están unidos. Adaptado de Isa & Dumas, 2021.

El gRNA puede dividirse a su vez en dos partes:

- crRNA: este RNA es complementario a la secuencia blanco que se desea alcanzar. Dentro de las bacterias, esta secuencia de ácidos nucleicos proviene de un intento de infección previo, y que posteriormente fue incorporado al genoma del procarionte. Normalmente esta secuencia se compone de 17 a 20 nucleótidos.
- trcrRNA: esta porción da soporte al sistema y funciona como un andamio para que el crRNA pueda unirse al material genético invasor (Shahbazi et al., 2023).

En la Figura 5 también se visualiza PAM (Protospacer Adjacent Motif, en inglés) la cual es una secuencia corta que tiene que estar presente para que la unión y corte se lleven a cabo de manera correcta. Esta secuencia, normalmente es menor a 5 nucleótidos, es esencial para que la bacteria pueda diferenciar su arreglo CRISPR del DNA bacteriano y evitar así un ataque autoinmune. Por otra parte, la proteína Cas9 es la enzima que se encargará de hacer el corte una vez que la secuencia es reconocida, por lo que es una proteína no específica, debido a que el reconocimiento de la secuencia blanco no está dentro de su labor. Esta proteína realizará un corte en la doble cadena para subsecuentemente inhabilitar la secuencia (Khadempar et al., 2019).

La biotecnología es un pilar fundamental para el desarrollo de nuevos métodos. Jennifer Doudna y Emmanuelle Charpentier obtuvieron el Premio Nobel por sus avances en el área de la Biotecnología, donde se elucidaba la posibilidad de crear un sgRNA (single guide RNA, en inglés) donde la parte del crRNA pudiera ser modificada tal y cómo fuera necesaria en el laboratorio (Jinek et al., 2012). Esto fue un parteaguas increíble, ya que abrió la posibilidad de poder editar el genoma de múltiples organismos incluyendo eucariotas diseñando un RNA guía específico para un gen blanco.

Una vez hecha la edición en el genoma por el sistema CRISPR/Cas, los mecanismos endógenos de reparación de las células permitirán reparar el corte hecho por la endonucleasa Cas (Figura 6). Para este fin, la doble cadena se puede unir a través de dos diferentes formas: Unión de extremos no homólogos (NHEJ, nonhomologous end joining) o mediante la Reparación dirigida por Homología (HDR, homology-directed repair). Al tener carencia de un templado para leer e introducir las bases homólogas, el mecanismo NHEJ carece de fidelidad y precisión, lo que conlleva a mutaciones de inserción y deleción ocasionando así la modificación del marco abierto de lectura teniendo como resultado final la aparición de un codón de paro prematuro, lo que deja la generación de mutantes knockouts del gen editado. Por otra parte, el mecanismo de HDR se puede lograr al

acompañar el complejo CRISPR/Cas con otra secuencia que sirva como templado para que la maquinaria celular pueda leerla y colocar una secuencia en específico en el lugar del corte. La elección del sistema de reparación depende de la finalidad del experimento, si solamente se quiere generar un organismo mutante no se agrega el DNA templado, por el contrario, si se desea reemplazar una secuencia completa por ejemplo de un gen mutado a un silvestre se necesitará agregar el templado que sirva de molde esperando que se favorezca el mecanismo de reparación por HDR (Ran et al., 2013).

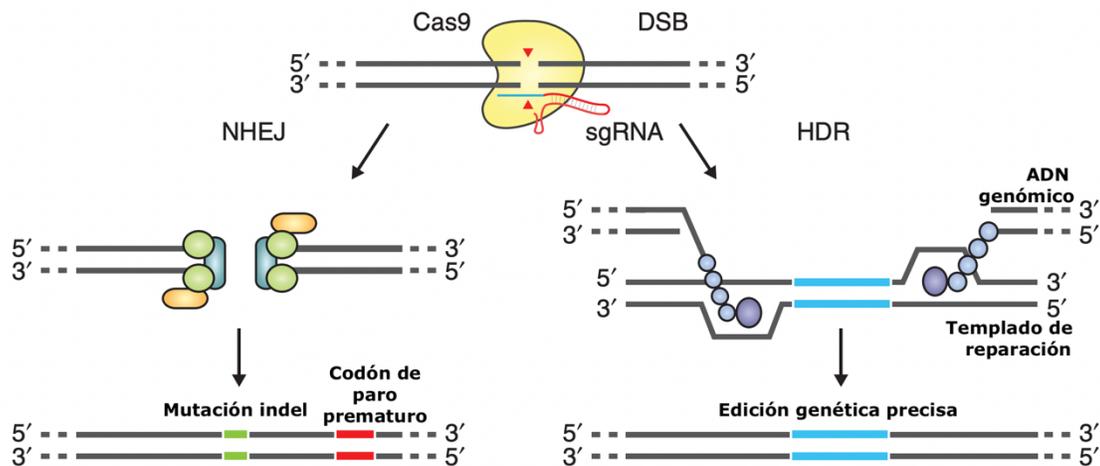


Figura 6. Mecanismos de reparación de la ruptura de la doble cadena (DSB por sus siglas en inglés). El mecanismo NHEJ da lugar a mutaciones que causan el corrimiento en el marco de lectura o codones de paro. Por otra parte, la reparación HDR es precisa al insertar un fragmento específico en el lugar de corte. Tomado y traducido de Ran et al., 2013.

5.2. IMPORTANCIA DEL DISEÑO DE LOS RNA GUÍAS

Si bien la proteína Cas9 toma la función de *tijeras*, es el RNA guía quien tiene la tarea de localizar y ensamblar la secuencia blanco, por lo que el diseño adecuado significa el éxito o fracaso del procedimiento (Mengstie & Wondimu, 2021). El escenario idóneo es que el RNA guía se una de manera única en un sitio del genoma para evitar así la edición en sitios inespecíficos (Konstantakos et al., 2022).

Varias características del gRNA interfieren para su correcto funcionamiento: el contenido de GC, el acceso a la cromatina, composición de la secuencia, temperatura de fusión e incluso la formación de estructuras secundarias (Liu et al., 2020). Para tratar de evitar algunos de estos problemas en el diseño de los gRNA se han implementado por convención tres diferentes métodos para su diseño (Konstantakos et al., 2022):

- a) Basado en la eficiencia de alineación con el genoma: donde los gRNA se alinean con la secuencia y se seleccionan al localizar el PAM.
- b) Basado en la hipótesis: donde los gRNA se diseñan con base en conocimientos previos o características específicas, como el contenido de GC.

- c) Basado en aprendizaje: la actividad es predicha con datos obtenidos anteriormente o modelos que han sido adaptados para dicho propósito.

Debido a que el primer método solo se basa en el alineamiento, los últimos dos suelen ser los que poseen la mayor tasa de éxito al tomar en cuenta más características que fomentan el anclaje del sistema.

La incursión de métodos computacionales han sido una gran herramienta de soporte en el diseño de los gRNA, entre ellos el uso de *machine learning*, lo que contribuye cada vez más a estar cerca de la *perfección* de esta técnica de edición genómica (Konstantakos et al., 2022). De hecho, en la actualidad existen múltiples programas para el diseño de los RNAs guías específicos para cada organismo (Mohr et al., 2016).

5.3. ENFOQUES MÁS UTILIZADOS DEL SISTEMA CRISPR/CAS9 EN EL LABORATORIO

El diseño del RNA guía es una de las tareas principales que permite el óptimo funcionamiento del sistema, sin embargo, no basta con diseñar el complejo, pues falta establecer cómo ingresará el sistema a la célula. Se requiere entonces de una vía, un método de transporte que funcione como acarreador del complejo para llevarlo y liberarlo

dentro de las células. Para este fin existen principalmente cuatro diferentes estrategias:

a) Plásmido que contiene a Cas9 y el templado del RNA guía

En este método el plásmido contiene las secuencias que codifican a la proteína Cas9 y al RNA guía. Entonces, la maquinaria celular se encargará de la transcripción de la Cas9 y de la síntesis del RNA guía para formar el complejo. Este enfoque es el más utilizado cuando se desea realizar edición genómica en un organismo (Liu et al., 2017).

b) Plásmido que contiene Cas9 y se añade un RNA guía sintético

El plásmido solamente contiene la información para codificar a la endonucleasa Cas9, mientras que el RNA guía es sintético. Ambas moléculas se mezclan para inducir la formación del complejo. Esta opción permite ahorrar un paso, pero es más complicado lograr la estabilidad al RNA guía (Wang et al., 2017).

c) mRNA de la Cas9 y RNA guía sintético

En este enfoque se añade al sistema el RNA mensajero de la Cas9, el cual necesita ser traducido por la maquinaria celular, además se añade el gRNA sintético para la formación del complejo (Liu et al., 2017)

d) RNP: Ribonucleoproteína

Los métodos que emplean plásmidos son los más utilizados y tienen grandes beneficios. Sin embargo, tienen algunas desventajas: la célula a editar debe de ser propensa a la transfección; los promotores deben escogerse con mucha precaución; además de que puede haber posibles retrasos en los procesos de transcripción y traducción (Hempstead, 2018).

Una alternativa para ello es introducir CRISPR/Cas9 como ribonucleoproteína. De esta manera obtenemos un método directo de liberación al omitir múltiples pasos que pueden interferir en la correcta edición genética. La ribonucleoproteína contiene el gRNA y la enzima Cas9 listas para realizar la edición, y puede ser introducida a través de microinyección o electroporación acompañada de vesículas lipídicas (Zhang et al., 2020).

Dentro del laboratorio existen diferentes propósitos, de los cuales dependerá la selección del enfoque de CRISPR que sea más adecuado para cubrir esas necesidades.

5.4. MÚLTIPLES APLICACIONES DEL SISTEMA CRISPR/CAS9

Los avances en la ingeniería genética nos han permitido obtener grandes beneficios que impactan la vida de las personas a través de descubrimientos novedosos como la técnica CRISPR/Cas, cuyos usos son numerosos en diferentes ámbitos debido a su eficacia y versatilidad. A continuación, se presentan algunos ejemplos relevantes al respecto.

A) Uso de CRISPR/Cas9 en organismos modelo

La edición genómica ha revolucionado el trabajo en los laboratorios de investigación. En los últimos años, el genoma de múltiples organismos modelo eucariotas ha sido modificado, lo que ha permitido avanzar rápidamente en estudios de investigación básica. Entre estos se encuentran:

La modificación genética de la levadura de *Saccharomyces cerevisiae* la cual es ampliamente utilizada en la investigación como en la industria alimentaria, lo que ha permitido elucidar nuevos mecanismos celulares y la mejora de cepas de interés industrial (Lee et al., 2015). Para el estudio de genes potenciales involucrados en procesos de desarrollo y/o enfermedades se ha realizado edición genómica en el pez cebra (modelo para el estudio en vertebrados) (Kesavan et al., 2018), en insectos como *Drosophila melanogaster* (Bahuguna et al., 2021) y en mamíferos pequeños como ratas y

ratones (Birling et al., 2017). La edición genética ha contribuido enormemente en la comprensión de diversas enfermedades incluyendo el cáncer. Asimismo, se ha utilizado CRISPR/Cas9 para editar líneas celulares incluyendo células humanas. Por mencionar un ejemplo del uso del sistema, en líneas celulares bovinas se editó el gen que codifica para el receptor CD46 que permite la entrada del pestivirus, produciendo así la diarrea viral bovina. La edición tuvo éxito evitando la infección viral, estableciendo así un precedente para que estos resultados sean extrapolados al organismo completo para obtener ganado resistente a las enfermedades más comunes (Szillat et al., 2020).

Hasta la fecha, se ha implementado la edición genética utilizando el sistema CRISPR/Cas9 prácticamente en todos los organismos modelos que se utilizan en los laboratorios de investigación mostrando la gran versatilidad del sistema y su potencial de aplicaciones.

B) Aplicaciones en la Industria alimentaria

La primera vez que se utilizó CRISPR para modificar y mejorar un cultivo fue en el arroz, el alimento más consumido a nivel mundial (Feng et al., 2013). Los resultados fueron exitosos y abrió la puerta a que se implementara la técnica en diversas plantas de interés agrícola. En 2017, utilizando el sistema CRISPR/Cas9 se realizaron varias modificaciones genéticas para mejorar la calidad del almidón

presente en la papa (Andersson et al., 2017). Otro ejemplo exitoso fue la generación de tomate con mayor cantidad de ácido γ -aminobutírico, el cual es un neurotransmisor muy importante en los mamíferos (Li et al., 2018). Estos solo son un par de ejemplos de cultivos modificados por la tecnología CRISPR/Cas para mejorar su valor nutricional y que actualmente ya se encuentran en el mercado de los Estados Unidos.

A diferencia de las plantas transgénicas, las cuales salen al mercado conteniendo genes de resistencia a herbicidas, las plantas editadas por CRISPR/Cas después de retrocruzas pierden los transgenes de selección o resistencia a los herbicidas y cualquier otro DNA foráneo por lo que estas plantas solo tendrán su propia información genética con la edición deseada. Así, las plantas editadas por CRISPR/Cas serán parecidas a las que se modifican por mutagénesis al azar, cuyo método consiste en tratar miles de semillas con radiación o algún compuesto químico que induzca mutaciones al azar para la generación de nuevas variedades de cultivos con las características deseadas. El problema con el mejoramiento por mutagénesis al azar es el tiempo que se requiere para las retrocruzas y que muchas veces se desconocía qué gen había sido modificado (Ahmar et al., 2020). Por lo tanto, la edición de genomas de plantas por CRISPR/Cas ha permitido

modificar con precisión el genoma y además ha reducido los tiempos para obtener nuevas variedades de cultivos para el mercado.

En general, la tecnología de CRISPR/Cas puede mejorar diferentes aspectos de las plantas como son el tamaño, cantidad de flor o fruto, así como conferir tolerancia a condiciones adversas del medio ambiente, reduciendo los tiempos para obtener mejores variedades y no conservan transgenes o material genético foráneo (Huang & Puchta, 2021).

C) Producción de metabolitos secundarios

Los hongos ocupan un rol de suma importancia en la industria biotecnológica, pues producen distintas moléculas como enzimas, ácidos orgánicos, metabolitos secundarios y ácidos grasos poliinsaturados. Estos compuestos pueden ser bioactivos, precursores de biocombustible e incluso pigmentos (Schuster & Kahmann, 2019). El uso de CRISPR ha permitido el mejoramiento de cepas incrementando el rendimiento de diferentes metabolitos secundarios de interés industrial producidos en hongos filamentosos (Wei et al., 2020). Sin bien es un área con un desarrollo general inferior a las investigaciones enfocadas en mamíferos o bacterias, la facilidad para modificar genéticamente los genomas fúngicos utilizando CRISPR representa un método más conveniente, por lo que se esperaría que

en los próximos años tome más relevancia (Schuster & Kahmann, 2019).

Muchos compuestos utilizados para fabricar medicamentos provienen de plantas, tal es el caso de los compuestos alcaloides, los cuales tienen gran importancia médica y muchos de ellos se obtienen a partir de la planta de amapola para crear fármacos como la morfina y la codeína. CRISPR ha sido utilizado en esta planta para controlar estas vías metabólicas a través de knock-outs y de esta manera regular la producción de sustancias con actividad biológica (Alagoz et al., 2016).

D) Terapia génica

La FDA define a la terapia génica como productos que logran sus efectos mediante la transcripción y/o traducción del material genético transferido y/o mediante la integración en el genoma del huésped y que se administran como ácidos nucleicos, virus o microorganismos modificados genéticamente. Los productos pueden usarse para modificar células *in vivo* o transferirse a células *ex vivo* antes de la administración al receptor (FDA, 2018).

Los inicios de la terapia génica empezaron a relucir en la década de 1960, donde se elucidaron algunos principios que permitieron establecer un precedente para la modificación genética de las células, entre ellos el haber logrado heredar cambios genéticos en líneas

celulares de mamíferos. Sin embargo, no fue hasta el 14 de septiembre de 1990 que la FDA aprobó por primera vez un protocolo de prueba para una terapia génica en humanos (Wirth et al., 2013). Sin embargo, no resultó con la eficiencia esperada.

Las terapias génicas se presentan como una alternativa para proveer beneficios clínicos a través de la corrección, adición o eliminación de genes. Este método ha sido objeto tanto de reconocimiento como de desconfianza debido a los fracasos clínicos que se han reportado. Debido a su eficacia y precisión, CRISPR se presenta como una nueva estrategia para desarrollar nuevas y más acertadas terapias que permitan obtener resultados exitosos (Uddin et al., 2020). Durante los últimos años se han publicado resultados concisos que respaldan esta premisa. En 2022 una farmacéutica dedicada a la edición genética reveló resultados de las Fases clínicas 1 y 2 de un tratamiento por terapia génica para curar la amaurosis congénita de Leber (LCA), el tratamiento utiliza el sistema CRISPR/Cas9 para editar el gen *CEP290*, que se encuentra mutado en los pacientes que han perdido la vista. El tratamiento resultó exitoso cambiando en algunas células de la retina la copia del gen mutado por la versión silvestre, causando así una recuperación parcial de la vista en los pacientes. Sin embargo, el número de individuos con ceguera que presentan esta mutación es muy bajo por lo que futuras investigaciones se realizarán para

mutaciones más representativas en pacientes de EE.UU (Editas Medicine, 2022).

Otro caso de éxito de la terapia génica aplicando el sistema de CRISPR/Cas9 ha sido en el tratamiento y cura de la leucemia linfoblástica aguda, padecimiento en niños el cual desencadena el cáncer pediátrico más frecuente (Emadi & York-Law, 2022). El tratamiento tradicional a esta enfermedad es la terapia de células T con receptores quiméricos de antígenos, la cual es un tratamiento altamente especializado e individualizado ya que se necesita modificar el genoma de las células T del paciente. Sin embargo, su tasa de éxito es baja y tiene múltiples efectos secundarios que pueden poner en riesgo la vida (Sterner & Sterner, 2021). Recientemente, se logró implementar un protocolo de terapia génica utilizando edición genómica, esta terapia resultó ser segura, efectiva y universal. Cinco de los seis niños que participaron en el estudio lograron la remisión completa de la enfermedad y sin efectos secundarios importantes. Esto se logró porque silenciaron el gen *CD52* y modificaron la cadena alfa del receptor T (Ottaviano et al., 2022).

Los 2 casos de terapia génica que se mencionaron anteriormente son de los estudios más avanzados que se han reportado hasta el momento, mostrando que la edición genómica por el sistema

CRISPR/Cas permitirá que se cristalice la cura de múltiples enfermedades de origen genético.

Otros ejemplos donde se ha utilizado CRISPR/Cas9 para la terapia génica están menos avanzados, sin embargo, estudios *in vitro* en líneas celulares estarían indicando un prometedor resultado en un futuro cercano. Por ejemplo, se ha estudiado la posibilidad de tratar la infección por Virus del Papiloma Humano (VPH), una infección de transmisión sexual (ITS) con alta prevalencia en las mujeres, realizando edición genómica en células vaginales para poder retirar la secuencia del agente patógeno y detener la enfermedad (Zhen et al., 2023). Otro interesante ejemplo es en el tratamiento del cáncer. El microambiente tumoral posee un conjunto de características que permiten la proliferación de los tumores, por lo que romper con este equilibrio puede traer consigo el deterioro de la progresión neoplásica (Anderson & Simon, 2020). La inmunosupresión en la zona tumoral puede ser reprogramada liberando el sistema CRISPR/Cas9 con ayuda de un probiótico, de esta manera la respuesta inmune se estimula a medida que estas bacterias inocuas colonizan los tejidos. También se producirán especies reactivas de oxígeno, lo que conllevará a la ruptura celular y posterior liberación del sistema para silenciar el gen *IDO1* que está relacionado con la inmunosupresión en el microambiente tumoral (Yu et al., 2022).

Actualmente se desarrollan cientos de líneas de investigación alrededor del mundo para implementar tratamientos de terapia génica para diversas enfermedades hereditarias o padecimientos que impliquen el cambio de información genética, aquí solo mencionamos unos pocos ejemplos para ilustrar como la edición genómica utilizando el sistema CRISPR/Cas9 permitirá finalmente que la terapia génica sea completamente una realidad en las próximas décadas.

Además, en este apartado se ha resumido de manera general las múltiples aplicaciones que se le está dando a los sistemas de CRISPR/Cas en diferentes áreas de investigación (Tabla 1) ilustrando como la edición genómica está revolucionando la ciencia.

Tabla 1. Resumen de las aplicaciones utilizando CRISPR/Cas9. Autoría propia.

Campo de aplicación	Uso
Organismos modelo	Establecer precedentes que permitan elucidar diferentes usos del sistema en eucariotes
Terapia génica	Curar enfermedades complejas a través de la modificación del genoma
Agricultura	Mejorar las características de beneficio comercial en los cultivos
Metabolitos secundarios	Aumentar el rendimiento de sustancias de interés biológico

6. VARIANTES DEL SISTEMA CRISPR/CAS

El sistema CRISPR usando a la Cas9 es la técnica más demandada y popular entre industrias, laboratorios y clínicas. Sin embargo, existen sistemas con variaciones en la enzima Cas que utilizan diferentes mecanismos para su funcionamiento. Cas12 y Cas13 surgieron algunos años después de Cas9 y se presentan como alternativas para editar DNA y RNA, respectivamente. Por otra parte, también es posible utilizar CRISPR/Cas sin su habilidad principal, la actividad de endonucleasa. Esto permite realizar modulación genética sin la necesidad de editar directamente el genoma. La elección de la variación del sistema dependerá enteramente de los objetivos que quieran ser alcanzados.

6.1. CRISPR/CAS12

La proteína Cas12a, también conocida como Cpf1, es una proteína más pequeña que Cas9. La diferencia clave con respecto a Cas9 es que Cas12a requiere una secuencia de reconocimiento más corta y puede cortar el DNA fuera de la secuencia de reconocimiento. Esto hace que Cas12a sea especialmente útil en la identificación de genes implicados en la reparación del DNA y la oncogénesis (Awwad *et al.*, 2023). Además, otra particularidad de la Cas12 es que su gRNA no contiene tracrRNA por lo que se compone únicamente de crRNA (Zetsche *et al.*, 2015).

El uso de esta técnica ha demostrado ser altamente sensible y específica, y se ha utilizado para la identificación de una amplia variedad de microorganismos (Qiu et al., 2022). Para lograrlo se mezcla Cas12 junto con crRNA y un reportero, posteriormente se añade el amplicón para poder ser reconocido por el complejo. Cuando el sistema hace el corte específico ocurre un evento llamado escisión colateral que es básicamente la activación de la enzima Cas12 para realizar un corte inespecífico que actuará sobre el reportero, causando así la liberación de una señal de fluorescencia o una señal de colorimetría que indica la presencia de la secuencia blanco (Mann & Pitts, 2022) (Figura 7). Si bien Cas12 reconoce únicamente DNA, es posible modificar su función para que actúe con RNA si se incorpora un paso de retrotranscripción durante el proceso (Qiu et al., 2022).

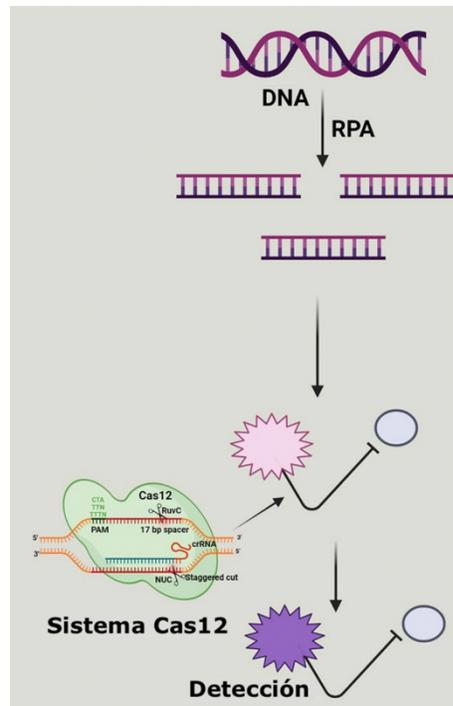


Figura 7. Detección de secuencias utilizando Cas 12. El DNA se amplifica utilizando la técnica de amplificación mediante recombinasa y polimerasa (RPA). Al aparearse la secuencia con Cas12 se realiza la función de endonucleasa y con la presencia del reportero se obtiene una señal de detección. Tomado y traducido de Hillary & Ceasar, 2023.

El uso de CRISPR/Cas12 en el diagnóstico de enfermedades infecciosas permite la detección temprana y precisa de patógenos, así como la identificación de nuevas variantes, lo que permite obtener más información en menor tiempo en comparación con los métodos tradicionales (Li et al., 2022).

Otra aplicación importante de CRISPR/Cas12 es la edición de genes. Los sistemas de edición genética basados en esta variante del sistema tienen la capacidad de introducir modificaciones precisas en el DNA de las células. Una técnica llamada MITI (Microhomology-dependent targeted integrations, integraciones dirigidas dependientes de

microhomología) permite la inserción precisa de fragmentos de DNA en lugares específicos del genoma (Li et al., 2020).

6.2. CRISPR/CAS13

El procesamiento de mRNA es un paso fundamental en la regulación de la expresión génica en los organismos vivos, y la capacidad de editar con precisión el RNA se ha vuelto cada vez más importante en la investigación y el tratamiento de enfermedades.

El sistema que utiliza la Cas13 permite reconocer secuencias específicas de RNA y cortarlas en presencia de un RNA guía complementario. El sistema se ha utilizado para editar RNA en diferentes organismos, incluyendo bacterias, plantas y animales. De hecho, se ha demostrado que el sistema CRISPR/Cas13a puede utilizarse para la edición de RNA en células humanas, por lo que podría tener aplicaciones para el tratamiento de enfermedades genéticas (Cox et al., 2017). Así mismo podría usarse como una herramienta potencial para la regulación de la expresión génica (O'Connell, 2019).

Además, el sistema también es una alternativa de terapia génica, al editar selectivamente moléculas de RNA que codifican proteínas específicas asociadas con el cáncer (Palaz et al., 2021). Otro gran potencial de uso en la terapia del cáncer tiene que ver con la demostración de que la actividad de Cas13 puede inducir la muerte

celular al unirse y degradar el RNA mensajero (mRNA) de genes específicos, como los oncogenes. Asimismo, esta variante del sistema se ha utilizado para la detección y eliminación específica de células cancerosas en cultivos celulares y modelos animales (Awwad et al., 2023). Cas13 ha sido utilizada también para inhibir la infección de VIH *in vitro* a través de la eliminación del RNA viral recién sintetizado proveniente del DNA genómico de células infectadas, así como del RNA que entra por primera vez a la célula, lo que representa una nueva alternativa terapéutica y de prevención (Yin et al., 2020).

Cas13a puede ser programada para utilizarse en pruebas para la detección de retrovirus y otros patógenos (Abudayyeh et al., 2017). También se podría utilizar para el diagnóstico y tratamiento del cáncer, detectando moléculas específicas de RNA presentes en células neoplásicas, lo que podría emplearse para el diagnóstico temprano de cáncer y a su vez para guiar la terapia (Palaz et al., 2021).

A modo de sintetizar las características de los sistemas, se presenta la siguiente tabla:

Tabla 2. Resumen de las diferencias y similitudes de los sistemas CRISPR/Cas

Sistema CRISPR (Clase 2)	Características
Cas9	<ul style="list-style-type: none"> -Tipo II -Edición de DNA -Versión más utilizada de todos los sistemas -Se compone de trcrRNA y crRNA -Reconoce un PAM rico en guanina -Posee dos dominios de nucleasa -Secuencia de aproximadamente 100 nt
Cas12	<ul style="list-style-type: none"> -Tipo V -Edición de DNA -No necesita de trcrRNA -Reconoce un PAM rico en timina -Posee un solo dominio de nucleasa -Secuencia de aproximadamente 42 nt
Cas13	<ul style="list-style-type: none"> -Tipo VII -Edición de RNA -El reconocimiento es mediado por PFS en lugar de PAM -Herramienta para modificar la expresión genética sin interferir con la secuencia del genoma -Secuencia de aproximadamente 60 nt

6.3. MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO BASADOS EN LA TECNOLOGÍA CRISPR/CAS

Como se mencionó en la sección anterior los sistemas de CRISPR/Cas se han adaptado para ser utilizados como métodos de detección y diagnóstico para diversos microorganismos patógenos de importancia clínica. Su uso conlleva algunas ventajas como la rapidez, procedimientos con pocos recursos y una mayor precisión. Las enfermedades y patógenos que pueden ser diagnosticadas

comprenden un grupo amplio y diverso. En esta sección se hablará de algunos ejemplos que han destacado en los últimos años.

La tuberculosis es una de las principales causas de muerte alrededor del mundo y la número uno en personas que viven con VIH. En 2021, 1.6 millones de personas murieron por esta infección micobacteriana (OMS, 2022). La resistencia a antibióticos mostrada por las cepas de esta bacteria, así como la dificultad de implementar exámenes para detectar esa resistencia se convierten en un problema para establecer un tratamiento para las personas enfermas. Para solucionar esto se ha desarrollado un método con Cas9 en conjunto con qPCR, el cual permite que en cuestión de horas se logre detectar si la muestra estudiada contiene variantes de *Mycobacterium tuberculosis* que contengan mutaciones relacionadas con la resistencia a ciertos antibióticos. Lo anterior se logró al diseñar gRNA específicos contra un grupo de mutaciones en alelos que han sido descritos en el pasado (Augustin & Agarwal, 2023).

Durante la reciente pandemia que ha afectado al mundo por el virus respiratorio SARS-CoV-2/COVID19 surgió la necesidad de desarrollar herramientas moleculares para una detección temprana de la infección en pacientes. Usando el sistema CRISPR/Cas12 se desarrolló una herramienta de diagnóstico para detectar SARS-CoV-2. Esta prueba de diagnóstico puede detectar el RNA del virus con alta

especificidad y sensibilidad en muestras de pacientes. La herramienta de diagnóstico es fácil de usar y se puede realizar en menos de una hora, lo que la convierte en una alternativa potencial a los métodos de diagnóstico existentes, como la PCR (Broughton et al., 2020). Cas12 también ha sido utilizado con éxito para detectar hepatitis B (Ding et al., 2021). En el desarrollo de estas pruebas de detección resalta el potencial que tiene CRISPR/Cas12 para ser utilizada en pruebas de diagnóstico de patógenos infecciosos.

No solamente Cas12 puede usarse para la detección rápida de virus, CRISPR/Cas13 también puede ser utilizado para este propósito con alta sensibilidad y especificidad.

Una herramienta de diagnóstico basada en Cas13 ha sido probada con éxito en muestras clínicas de pacientes infectados con el virus del Zika y dengue, así como en sangre humana con virus del Ébola. Esta herramienta puede detectar el RNA viral en menos de una hora y podría ser utilizada sin necesidad de electricidad o equipo de laboratorio especializado (Myhrvold et al., 2018).

Para ilustrar todo lo anterior, en la Figura 8 se muestra un esquema general de la detección de secuencias utilizando CRISPR/Cas:

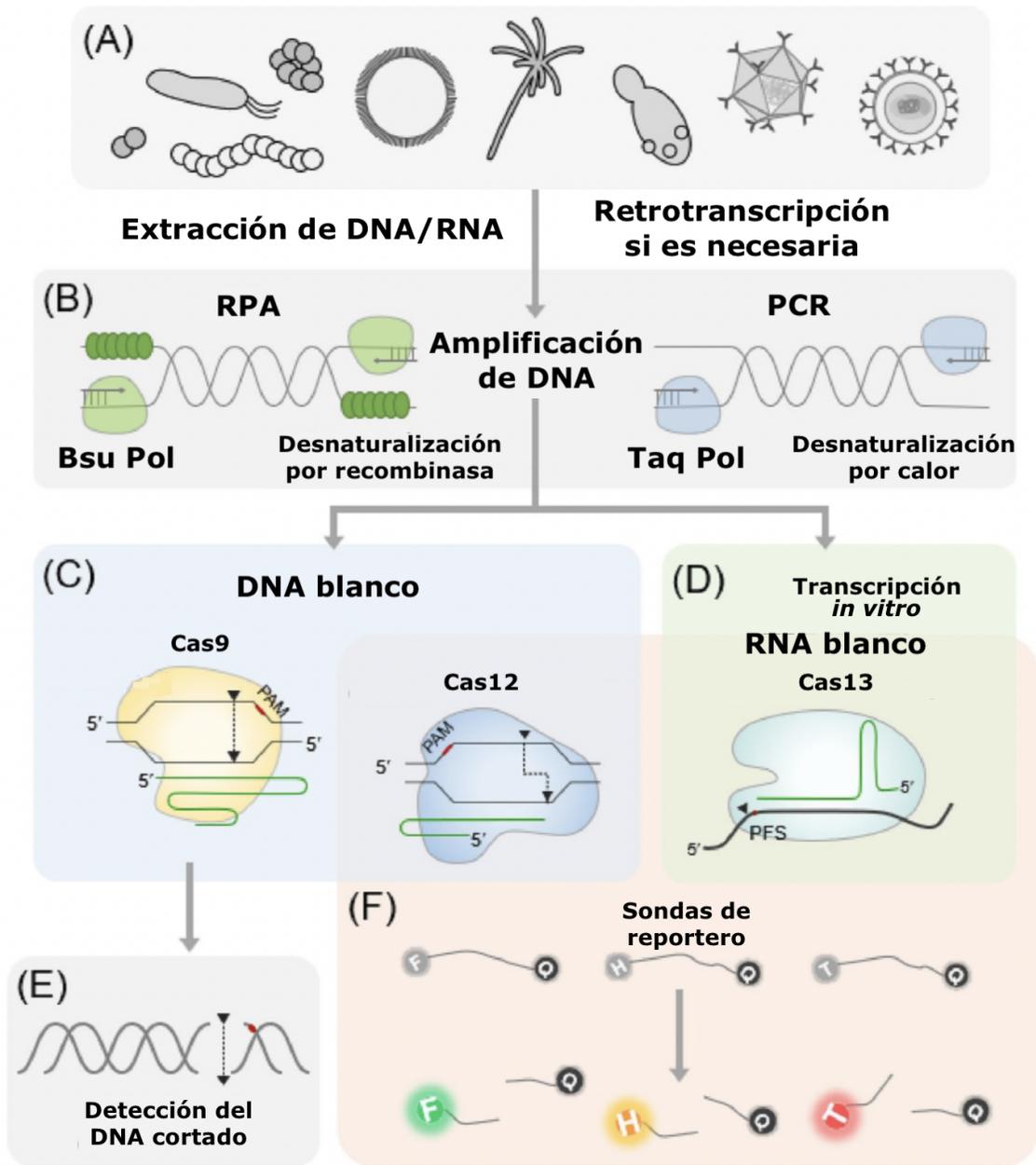


Figura 8. Detección de ácidos nucleicos utilizando CRISPR/Cas. **A)** El material genético es extraído del microorganismo y de tratarse de RNA se realiza retro transcripción. **B)** La secuencia es amplificada por RPA o PCR. **C)** La secuencia es reconocida y cortada por la proteína Cas correspondiente. **D)** En los sistemas CRISPR que reconocen RNA se realiza una retrotranscripción in vitro. **E)** En Cas9 se reconoce la secuencia como tal. **F)** En Cas12 y Cas13 la secuencia es reconocida con ayuda de sondas reporteras. Tomado y adaptado de Jeong et al., 2023.

6.4. FUNCIONES DEL SISTEMA CRISPR/CAS9 SIN ACTIVIDAD DE ENDONUCLEASA

Como se ha mencionado a lo largo de este trabajo, el sistema CRISPR/Cas9 ha sido ampliamente utilizado en la edición genética para corregir mutaciones, eliminar genes o insertar nuevas secuencias de DNA en el genoma. Sin embargo, se han desarrollado variantes del sistema CRISPR/Cas que permiten la modulación de la expresión génica sin cortar el DNA. Estas variantes son conocidas como sistemas CRISPR/Cas9 sin actividad de endonucleasa (dCas9), ya que utilizan una versión mutada de Cas9 que aún forma el complejo con el RNA guía para dirigirse a la región específica del genoma, pero sin habilidad de cortarla. Esta versión del sistema se ha utilizado como un enfoque de modulación de la expresión génica en células vivas y ha demostrado ser útil para una variedad de aplicaciones, desde la investigación básica hasta la medicina (Sander & Joung, 2014).

Para el uso de este enfoque se diseñan proteínas de fusión entre dCas9 y reguladores de la expresión génica ya sean activadores o represores. Estas proteínas de fusión se unirán a las secuencias de regiones promotoras de un gen o grupo de genes. Además, se han desarrollado dos sistemas de regulación independientes que se pueden utilizar juntos o por separado: uno utiliza un interruptor ON-OFF, y el otro es un sistema inducible que permite controlar la expresión génica de manera temporal y reversible, lo cual lo hace

altamente versátil y adaptable a diferentes necesidades experimentales (Gao et al., 2016). Estos sistemas se resumen en la Figura 9.

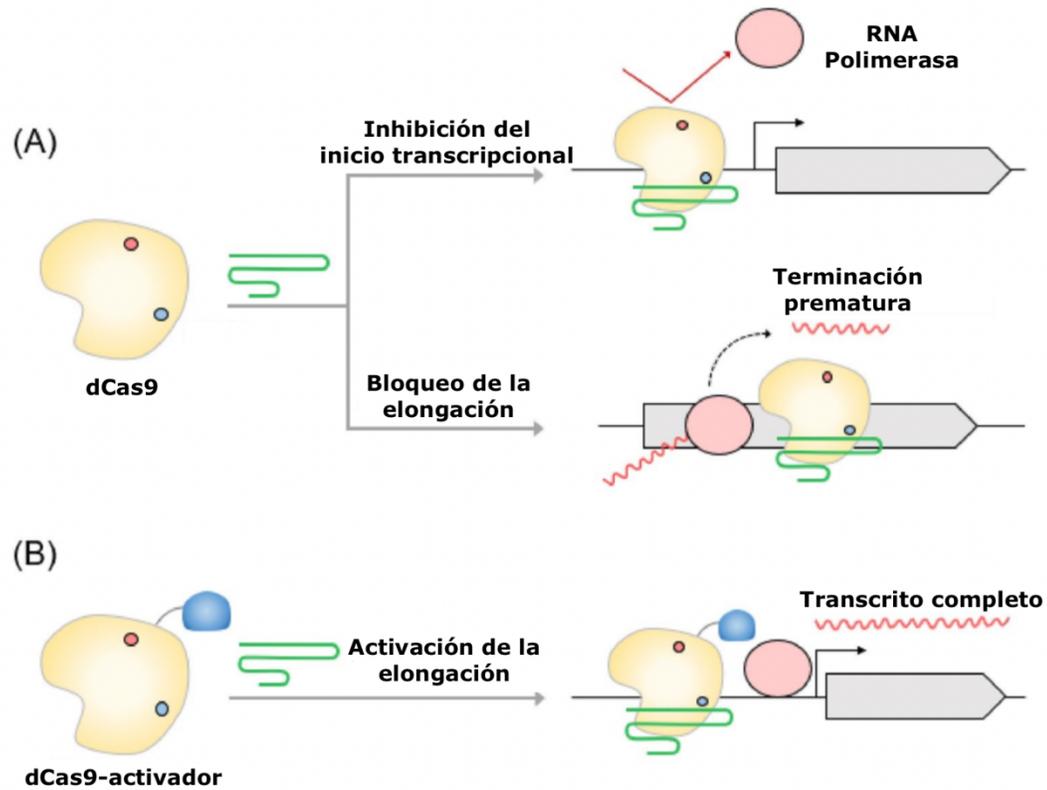


Figura 9. Regulación transcripcional usando dCas. **A)** dCas9 bloquea el inicio o elongación de la RNA Polimerasa. **B)** dCas9 combinada con un activador se une río arriba del blanco molecular para promover la transcripción del gen. Tomado y traducido de Jeong et al., 2023.

La tecnología de fusión de dCas9 con proteínas efectoras ha llevado a la creación de sistemas de edición epigenética en plantas. Por ejemplo, CRISPR/dCas9 fusionada a metilasas o desmetilasas que pueden dirigirse a regiones específicas del genoma y alterar los patrones de metilación del DNA. Estos sistemas pueden ser utilizados para manipular la expresión de genes endógenos o la metilación del

DNA, lo que puede tener implicaciones importantes en la mejora de cultivos y la resistencia a enfermedades (Karlson et al., 2021).

Recientemente, la dCas se ha utilizado en la detección de moléculas pequeñas que no son ácidos nucleicos. Como modelo se utilizó la teofilina, un compuesto utilizado en el tratamiento de enfermedades pulmonares. El método, denominado Bio-SCAN V2 utiliza una sonda de RNA diseñada específicamente para unirse a la teofilina y modificada con dCas9 para una mayor especificidad. Cuando se adiciona la muestra al ensayo, la sonda se une a la teofilina presente en la muestra y la proteína dCas9 incorporada a la sonda desencadena una reacción enzimática que produce una señal visual en el ensayo (Jiang et al., 2023).

6.5. OTRAS VARIANTES DEL SISTEMA CRISPR/CAS

Desde que apareció el sistema CRISPR/Cas como una técnica de edición genómica han surgido versiones más sofisticadas del sistema tales como: 1) la edición genómica de múltiples genes, esto gracias a que en una sola construcción se incluyen hasta 10 RNAs guías que se aparearan con la secuencia de 10 genes diferentes (Doll et al., 2019); 2) también se ha obtenido el sistema mejorado para lograr la edición de un solo nucleótido, lo que ha permitido hacer mutaciones puntuales con precisión (Okamoto et al., 2019); 3) también se han desarrollado versiones que logran la edición específica en el DNA

organelar (Yin et al., 2022) y 4) versiones de CRISPR/Cas9 que permiten hacer la edición de manera inducible y/o tejido específico (Koreman et al., 2021). Todos estos enfoques están revolucionando los estudios de manipulación genética en diferentes campos de investigación.

Por ejemplo, los sistemas CRISPR/Cas han permitido acelerar el proceso de mejora de plantas al permitir la edición precisa y dirigida de los genes de interés, lo cual anteriormente se realizaba de manera lenta, costosa e inespecífica por procedimientos de mejora tradicional (Wolter et al., 2019). En este contexto se han creado sistemas específicos en plantas adicionales a las antes mencionadas. Se ha utilizado CRISPR/Cas para inducir rupturas en los cromosomas de *Arabidopsis thaliana* y suprimir la recombinación homóloga durante la reparación de estas rupturas, lo que permitió la generación de nuevas variedades de plantas con cromosomas diseñados específicamente (Rönspies et al., 2022). Recientemente, se ha publicado el sistema CRISPR-Combo que utiliza una combinación de dos enzimas CRISPR: Cas9 y Cas12a para aumentar la tasa de edición de genes en plantas. Además, el sistema permite la edición de múltiples sitios de genes simultáneamente, lo que aumenta la eficiencia y precisión de la edición genética en estos organismos (Pan et al., 2022).

7. CONCLUSIONES

La tecnología CRISPR/Cas ya ha mostrado un progreso significativo en el desarrollo de nuevas herramientas moleculares. Su especificidad y versatilidad han abierto nuevas posibilidades en distintos ámbitos de la ciencia. Con el desarrollo continuo de nuevas alternativas basadas en CRISPR, se espera que esta tecnología continúe refinándose y que sus aplicaciones se expandan aún más. Sin embargo, antes de la amplia utilización de la tecnología CRISPR/Cas, deben abordarse importantes desafíos técnicos y éticos. La seguridad y los efectos fuera del blanco molecular de las terapias basadas en CRISPR requieren una mayor investigación para garantizar que se minimicen los posibles riesgos, y las consideraciones éticas deben ser cuidadosamente valoradas para asegurar que los beneficios de la edición del genoma se realicen evitando consecuencias no deseadas. Por lo tanto, es crucial que los investigadores y los políticos trabajen juntos para asegurar que el desarrollo y el uso de las tecnologías basadas en CRISPR sean responsables, éticas y seguras para los usuarios. Con la regulación y supervisión adecuadas, CRISPR/Cas tiene el potencial de transformar el campo de la medicina genética y proporcionar nuevas vías para el tratamiento de enfermedades.

8. REFERENCIAS

- Abudayyeh, O. O., Gootenberg, J. S., Essletzbichler, P., Han, S., Joung, J., Belanto, J. J., Verdine, V., Cox, D. B. T., Kellner, M. J., Regev, A., Lander, E. S., Voytas, D. F., Ting, A. Y., & Zhang, F. (2017). RNA targeting with CRISPR-Cas13. *Nature*, *550*(7675), 280–284. <https://doi.org/10.1038/nature24049>
- Ahmar, S., Gill, R. A., Jung, K.-H., Faheem, A., Qasim, M. U., Mubeen, M., & Zhou, W. (2020). Conventional and Molecular Techniques from Simple Breeding to Speed Breeding in Crop Plants: Recent Advances and Future Outlook. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(7), 2590. <https://doi.org/10.3390/ijms21072590>
- Alagoz, Y., Gurkok, T., Zhang, B., & Unver, T. (2016). Manipulating the Biosynthesis of Bioactive Compound Alkaloids for Next-Generation Metabolic Engineering in Opium Poppy Using CRISPR-Cas 9 Genome Editing Technology. *Scientific Reports*, *6*(1), 30910. <https://doi.org/10.1038/srep30910>
- Anderson, N. M., & Simon, M. C. (2020). The tumor microenvironment. En *Current Biology* (Vol. 30, Número 16, pp. R921–R925). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.06.081>
- Andersson, M., Turesson, H., Nicolia, A., Fält, A. S., Samuelsson, M., & Hofvander, P. (2017). Efficient targeted multiallelic mutagenesis in tetraploid potato (*Solanum tuberosum*) by transient CRISPR-Cas9 expression in protoplasts. *Plant Cell Reports*, *36*(1), 117–128. <https://doi.org/10.1007/s00299-016-2062-3>
- Augustin, L., & Agarwal, N. (2023). Designing a Cas9/gRNA-assisted quantitative Real-Time PCR (CARP) assay for identification of point mutations leading to rifampicin resistance in the human pathogen *Mycobacterium tuberculosis*. *Gene*, *857*, 147173. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2023.147173>
- Awwad, S. W., Serrano-Benitez, A., Thomas, J. C., Gupta, V., & Jackson, S. P. (2023). Revolutionizing DNA repair research and cancer therapy with CRISPR–Cas screens. En *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41580-022-00571-x>

- Bahuguna, S., Redhai, S., Zhou, J., Wang, T., Port, F., & Boutros, M. (2021). Conditional crispr-cas genome editing in drosophila to generate intestinal tumors. *Cells*, *10*(11). <https://doi.org/10.3390/cells10113156>
- Baker, B. J., De Anda, V., Seitz, K. W., Dombrowski, N., Santoro, A. E., & Lloyd, K. G. (2020). Diversity, ecology and evolution of Archaea. En *Nature Microbiology* (Vol. 5, Número 7, pp. 887–900). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0715-z>
- Bevan, M. W., Flavell, R. B., & Chilton, M.-D. (1983). A chimaeric antibiotic resistance gene as a selectable marker for plant cell transformation. *Nature*, *304*(5922), 184–187. <https://doi.org/10.1038/304184a0>
- Birling, M. C., Herault, Y., & Pavlovic, G. (2017). Modeling human disease in rodents by CRISPR/Cas9 genome editing. *Mammalian Genome*, *28*(7–8), 291–301. <https://doi.org/10.1007/s00335-017-9703-x>
- Bolotin, A., Quinquis, B., Sorokin, A., & Dusko Ehrlich, S. (2005). Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology*, *151*(8), 2551–2561. <https://doi.org/10.1099/mic.0.28048-0>
- Broughton, J. P., Deng, X., Yu, G., Fasching, C. L., Servellita, V., Singh, J., Miao, X., Streithorst, J. A., Granados, A., Sotomayor-Gonzalez, A., Zorn, K., Gopez, A., Hsu, E., Gu, W., Miller, S., Pan, C. Y., Guevara, H., Wadford, D. A., Chen, J. S., & Chiu, C. Y. (2020). CRISPR–Cas12-based detection of SARS-CoV-2. *Nature Biotechnology*, *38*(7), 870–874. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0513-4>
- Chavez, M., Chen, X., Finn, P. B., & Qi, L. S. (2023). Advances in CRISPR therapeutics. En *Nature Reviews Nephrology* (Vol. 19, Número 1, pp. 9–22). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41581-022-00636-2>
- Chávez-Jacobo, V. (2018). El sistema de edición genética CRISPR/Cas y su uso como antimicrobiano específico. *TIP. Revista especializada en ciencias químico-biológicas*, *21*(2), 90–95.

- Cohen, S. N. (2013). DNA cloning: A personal view after 40 years. En *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (Vol. 110, Número 39, pp. 15521–15529).
<https://doi.org/10.1073/pnas.1313397110>
- Cox, D. B. T., Gootenberg, J. S., Abudayyeh, O. O., Franklin, B., Kellner, M. J., Joung, J., & Zhang, F. (2017). *RNA editing with CRISPR-Cas13*.
- Ding, R., Long, J., Yuan, M., Zheng, X., Shen, Y., Jin, Y., Yang, H., Li, H., Chen, S., & Duan, G. (2021). Crispr/cas12-based ultra-sensitive and specific point-of-care detection of hbv. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(9). <https://doi.org/10.3390/ijms22094842>
- Doll, N. M., Gilles, L. M., Gérentes, M.-F., Richard, C., Just, J., Fierlej, Y., Borrelli, V. M. G., Gendrot, G., Ingram, G. C., Rogowsky, P. M., & Widiez, T. (2019). Single and multiple gene knockouts by CRISPR–Cas9 in maize. *Plant Cell Reports*, 38(4), 487–501.
<https://doi.org/10.1007/s00299-019-02378-1>
- Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2014). *The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9*. <http://science.sciencemag.org/>
- Editas Medicine. (2022). *Editas Medicine Announces Clinical Data Demonstrating Proof of Concept of EDIT-101 from Phase 1/2 BRILLIANCE Trial*. www.editasmedicine.com.
- Emadi, A., & York-Law, J. (2022, junio). *Leucemia linfoblástica aguda (LLA)*.
<https://www.msmanuals.com/es-mx/professional/hematolog%C3%A0Da-y-oncolog%C3%ADa/leucemias/leucemia-linfobl%C3%A1stica-aguda-lla>
- Feng, Z., Zhang, B., Ding, W., Liu, X., Yang, D. L., Wei, P., Cao, F., Zhu, S., Zhang, F., Mao, Y., & Zhu, J. K. (2013). Efficient genome editing in plants using a CRISPR/Cas system. En *Cell Research* (Vol. 23, Número 10, pp. 1229–1232). <https://doi.org/10.1038/cr.2013.114>
- Gaj, T., Sirk, S. J., Shui, S. L., & Liu, J. (2016). Genome-editing technologies: Principles and applications. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 8(12).
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a023754>

- Gao, Y., Xiong, X., Wong, S., Charles, E. J., Lim, W. A., & Qi, L. S. (2016). Complex transcriptional modulation with orthogonal and inducible dCas9 regulators. *Nature Methods*, *13*(12), 1043–1049. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4042>
- Gupta, R. M., & Musunuru, K. (2014). Expanding the genetic editing tool kit: ZFNs, TALENs, and CRISPR-Cas9. *Journal of Clinical Investigation*, *124*(10), 4154–4161. <https://doi.org/10.1172/JCI72992>
- Hempstead, A. (2018). *Addgene's CRISPR eBook* (3a ed.). addgene.
- Hillary, V. E., & Ceasar, S. A. (2023). A Review on the Mechanism and Applications of CRISPR/Cas9/Cas12/Cas13/Cas14 Proteins Utilized for Genome Engineering. En *Molecular Biotechnology* (Vol. 65, Número 3, pp. 311–325). Springer. <https://doi.org/10.1007/s12033-022-00567-0>
- Howell-Moroney, M. (2022). CRISPR-cas9. En *Embryo Project Encyclopedia*. Arizona State University.
- Huang, T. K., & Puchta, H. (2021). Novel CRISPR/Cas applications in plants: from prime editing to chromosome engineering. *Transgenic Research*, *30*(4), 529–549. <https://doi.org/10.1007/s11248-021-00238-x>
- Isa, H. H. S., & Dumas, C. (2021). An Analysis of SARS-CoV-2 on the Molecular and Subatomic Levels through Applied I-Theory. *Advances in Microbiology*, *11*(02), 75–89. <https://doi.org/10.4236/aim.2021.112006>
- Ishino, Y., Krupovic, M., & Forterre, P. (2018). History of CRISPR-Cas from encounter with a mysterious repeated sequence to genome editing technology. *Journal of Bacteriology*, *200*(7). <https://doi.org/10.1128/JB.00580-17>
- Jaenisch, R., & Mintzt, B. (1974). *Simian Virus 40 DNA Sequences in DNA of Healthy Adult Mice Derived from Preimplantation Blastocysts Injected with Viral DNA (blastocyst microinjection in vitro/development/DNA reassociation kinetics of simian virus 40)* (Vol. 71, Número 4).

- Jansen, R., van Embden, J. D. A., Gaastra, W., & Schouls, L. M. (2002). Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Molecular Microbiology*, 43(6), 1565–1575. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02839.x>
- Jeong, S. H., Lee, H. J., & Lee, S. J. (2023). Recent Advances in CRISPR-Cas Technologies for Synthetic Biology. En *Journal of Microbiology* (Vol. 61, Número 1, pp. 13–36). The Korean Society for Microbiology / The Korean Society of Virology. <https://doi.org/10.1007/s12275-022-00005-5>
- Jiang, C., Lv, G., Tu, Y., Cheng, X., Duan, Y., Zeng, B., & He, B. (2021). Applications of CRISPR/Cas9 in the Synthesis of Secondary Metabolites in Filamentous Fungi. En *Frontiers in Microbiology* (Vol. 12). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.638096>
- Jiang, W., Aman, R., Ali, Z., & Mahfouz, M. (2023). Bio-SCAN V2: A CRISPR/dCas9-based lateral flow assay for rapid detection of theophylline. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2023.1118684>
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2012). A programmable dual RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity *One-Sentence Summary*.
- Kalinina, N. O., Khromov, A., Love, A. J., & Taliansky, M. E. (2020). CRISPR applications in plant virology: Virus resistance and beyond. *Phytopathology*, 110(1), 18–28. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-07-19-0267-IA>
- Kaminski, M. M., Abudayyeh, O. O., Gootenberg, J. S., Zhang, F., & Collins, J. J. (2021). CRISPR-based diagnostics. En *Nature Biomedical Engineering* (Vol. 5, Número 7, pp. 643–656). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41551-021-00760-7>
- Karlson, C. K. S., Mohd-noor, S. N., Nolte, N., & Tan, B. C. (2021). Crispr/dcas9-based systems: Mechanisms and applications in plant sciences. En *Plants* (Vol. 10, Número 10). MDPI. <https://doi.org/10.3390/plants10102055>

- Kesavan, G., Hammer, J., Hans, S., & Brand, M. (2018). Targeted knock-in of CreER T2 in zebrafish using CRISPR/Cas9. *Cell and Tissue Research*, 372(1), 41–50.
<https://doi.org/10.1007/s00441-018-2798-x>
- Khadempar, S., Familghadakchi, S., Motlagh, R. A., Farahani, N., Dashtiahangar, M., Rezaei, H., & Gheibi Hayat, S. M. (2019). CRISPR–Cas9 in genome editing: Its function and medical applications. En *Journal of Cellular Physiology* (Vol. 234, Número 5, pp. 5751–5761). Wiley-Liss Inc. <https://doi.org/10.1002/jcp.27476>
- Kim, H., & Kim, J. S. (2014). A guide to genome engineering with programmable nucleases. En *Nature Reviews Genetics* (Vol. 15, Número 5, pp. 321–334). Nature Publishing Group.
<https://doi.org/10.1038/nrg3686>
- Konstantakos, V., Nentidis, A., Krithara, A., & Paliouras, G. (2022). CRISPR-Cas9 gRNA efficiency prediction: an overview of predictive tools and the role of deep learning. En *Nucleic Acids Research* (Vol. 50, Número 7, pp. 3616–3637). Oxford University Press.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkac192>
- Koreman, G. T., Xu, Y., Hu, Q., Zhang, Z., Allen, S. E., Wolfner, M. F., Wang, B., & Han, C. (2021). Upgraded CRISPR/Cas9 tools for tissue-specific mutagenesis in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(14).
<https://doi.org/10.1073/pnas.2014255118>
- Lee, N. C. O., Larionov, V., & Kouprina, N. (2015). Highly efficient CRISPR/Cas9-mediated TAR cloning of genes and chromosomal loci from complex genomes in yeast. *Nucleic Acids Research*, 43(8), e55.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkv112>
- Li, J., Wang, Y., Wang, B., Lou, J., Ni, P., Jin, Y., Chen, S., Duan, G., & Zhang, R. (2022). Application of CRISPR/Cas Systems in the Nucleic Acid Detection of Infectious Diseases. En *Diagnostics* (Vol. 12, Número 10). MDPI. <https://doi.org/10.3390/diagnostics12102455>

- Li, P., Zhang, L., Li, Z., Xu, C., Du, X., & Wu, S. (2020). Cas12a mediates efficient and precise endogenous gene tagging via MITI: microhomology-dependent targeted integrations. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 77(19), 3875–3884. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03396-8>
- Li, R., Li, R., Li, X., Fu, D., Zhu, B., Tian, H., Luo, Y., & Zhu, H. (2018). Multiplexed CRISPR/Cas9-mediated metabolic engineering of γ -aminobutyric acid levels in *Solanum lycopersicum*. *Plant Biotechnology Journal*, 16(2), 415–427. <https://doi.org/10.1111/pbi.12781>
- Liu, C., Zhang, L., Liu, H., & Cheng, K. (2017). Delivery strategies of the CRISPR-Cas9 gene-editing system for therapeutic applications. En *Journal of Controlled Release* (Vol. 266, pp. 17–26). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.09.012>
- Liu, G., Zhang, Y., & Zhang, T. (2020). Computational approaches for effective CRISPR guide RNA design and evaluation. En *Computational and Structural Biotechnology Journal* (Vol. 18, pp. 35–44). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2019.11.006>
- Manghwar, H., Lindsey, K., Zhang, X., & Jin, S. (2019). CRISPR/Cas System: Recent Advances and Future Prospects for Genome Editing. En *Trends in Plant Science* (Vol. 24, Número 12, pp. 1102–1125). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2019.09.006>
- Mann, J. G., & Pitts, R. J. (2022). PrimedSherlock: a tool for rapid design of highly specific CRISPR-Cas12 crRNAs. *BMC Bioinformatics*, 23(1), 428. <https://doi.org/10.1186/s12859-022-04968-5>
- Mengstie, M. A., & Wondimu, B. Z. (2021). Mechanism and applications of crispr/ cas-9-mediated genome editing. En *Biologics: Targets and Therapy* (Vol. 15, pp. 353–361). Dove Medical Press Ltd. <https://doi.org/10.2147/BTT.S326422>
- Mohr, S. E., Hu, Y., Ewen-Campen, B., Housden, B. E., Viswanatha, R., & Perrimon, N. (2016). CRISPR guide RNA design for research applications. *The FEBS Journal*, 283(17), 3232–3238. <https://doi.org/10.1111/febs.13777>

- Mojica, F. J. M., Juez, G., & Rodriguez-Valera, F. (1993). Transcription at different salinities of *Haloferax mediterranei* sequences adjacent to partially modified PstI sites. En *Molecular Microbiology* (Vol. 9, Número 3).
- Mosterd, C., Rousseau, G. M., & Moineau, S. (2021). A short overview of the crisper-cas adaptation stage1. *Canadian Journal of Microbiology*, 67(1), 1–12. <https://doi.org/10.1139/cjm-2020-0212>
- Myhrvold, C., Freije, C. A., Gootenberg, J. S., Abudayyeh, O. O., Metsky, H. C., Durbin, A. F., Kellner, M. J., Tan, A. L., Paul, L. M., Parham, L. A., Garcia, K. F., Barnes, K. G., Chak, B., Mondini, A., Nogueira, M. L., Isern, S., Michael, S. F., Lorenzana, I., Yozwiak, N. L., ... Sabeti, P. C. (2018). Field-deployable viral diagnostics using CRISPR-Cas13. *Science*, 360(6387), 444–448. <https://doi.org/10.1126/science.aas8836>
- Newsom, S., Parameshwaran, H. P., Martin, L., & Rajan, R. (2021). The CRISPR-Cas Mechanism for Adaptive Immunity and Alternate Bacterial Functions Fuels Diverse Biotechnologies. En *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* (Vol. 10). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.619763>
- O’Connell, M. R. (2019). Molecular Mechanisms of RNA Targeting by Cas13-containing Type VI CRISPR–Cas Systems. En *Journal of Molecular Biology* (Vol. 431, Número 1, pp. 66–87). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2018.06.029>
- Okamoto, S., Amaishi, Y., Maki, I., Enoki, T., & Mineno, J. (2019). Highly efficient genome editing for single-base substitutions using optimized ssODNs with Cas9-RNPs. *Scientific Reports*, 9(1), 4811. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41121-4>
- Ottaviano, G., Georgiadis, C., Gkazi, S. A., Syed, F., Zhan, H., Etuk, A., Preece, R., Chu, J., Kubat, A., Adams, S., Veys, P., Vora, A., Rao, K., Qasim, W., James, J., Gilmour, K., Inglott, S., Thomas, R., Mhaldien, L., ... Kim, D. (2022). Phase 1 clinical trial of CRISPR-engineered CAR19 universal T cells for treatment of children with refractory B cell leukemia. *Science Translational Medicine*, 14(668). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abq3010>

- Palaz, F., Kalkan, A. K., Can, Ö., Demir, A. N., Tozluyurt, A., Özcan, A., & Ozsoz, M. (2021). CRISPR-Cas13 System as a Promising and Versatile Tool for Cancer Diagnosis, Therapy, and Research. En *ACS Synthetic Biology* (Vol. 10, Número 6, pp. 1245–1267). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.1c00107>
- Pan, C., Li, G., Malzahn, A. A., Cheng, Y., Leyson, B., Sretenovic, S., Gurel, F., Coleman, G. D., & Qi, Y. (2022). Boosting plant genome editing with a versatile CRISPR-Combo system. *Nature Plants*, 8(5), 513–525. <https://doi.org/10.1038/s41477-022-01151-9>
- Qi, L. S., Larson, M. H., Gilbert, L. A., Doudna, J. A., Weissman, J. S., Arkin, A. P., & Lim, W. A. (2013). Repurposing CRISPR as an RNA-Guided Platform for Sequence-Specific Control of Gene Expression. *Cell*, 152(5), 1173–1183. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.02.022>
- Qiu, M., Zhou, X. M., & Liu, L. (2022). Improved Strategies for CRISPR-Cas12-based Nucleic Acids Detection. En *Journal of Analysis and Testing* (Vol. 6, Número 1, pp. 44–52). Nonferrous Metals Society of China. <https://doi.org/10.1007/s41664-022-00212-4>
- Ran, F. A., Hsu, P. D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D. A., & Zhang, F. (2013). Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature Protocols*, 8(11), 2281–2308. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.143>
- Rönspies, M., Schmidt, C., Schindele, P., Lieberman-Lazarovich, M., Houben, A., & Puchta, H. (2022). Massive crossover suppression by CRISPR–Cas-mediated plant chromosome engineering. *Nature Plants*, 8(10), 1153–1159. <https://doi.org/10.1038/s41477-022-01238-3>
- Sander, J. D., & Joung, J. K. (2014). CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. En *Nature Biotechnology* (Vol. 32, Número 4, pp. 347–350). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nbt.2842>
- Schuster, M., & Kahmann, R. (2019). CRISPR-Cas9 genome editing approaches in filamentous fungi and oomycetes. *Fungal Genetics and Biology*, 130, 43–53. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2019.04.016>

- Shahbazi, R., Lipson, P., Gottimukkala, K. S. V., Lane, D. D., & Adair, J. E. (2023). *CRISPR Gene Editing of Hematopoietic Stem and Progenitor Cells* (pp. 39–62). https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2679-5_4
- Shamshirgaran, Y., Liu, J., Sumer, H., Verma, P. J., & Taheri-Ghahfarokhi, A. (2022). *Tools for Efficient Genome Editing; ZFN, TALEN, and CRISPR* (pp. 29–46). https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2301-5_2
- Silas, S., Mohr, G., Sidote, D. J., Markham, L. M., Sanchez-Amat, A., Bhaya, D., Lambowitz, A. M., & Fire, A. Z. (2016). Direct CRISPR spacer acquisition from RNA by a natural reverse transcriptase-Cas1 fusion protein. *Science*, *351*(6276). <https://doi.org/10.1126/science.aad4234>
- Sterner, R. C., & Sterner, R. M. (2021). CAR-T cell therapy: current limitations and potential strategies. En *Blood Cancer Journal* (Vol. 11, Número 4). Springer Nature. <https://doi.org/10.1038/s41408-021-00459-7>
- Szillat, K. P., Koethe, S., Wernike, K., Höper, D., & Beer, M. (2020). A CRISPR/Cas9 generated bovine CD46-knockout cell line—a tool to elucidate the adaptability of bovine viral diarrhoea viruses (BVDV). *Viruses*, *12*(8). <https://doi.org/10.3390/v12080859>
- The University of Edinburgh. (2017). *The Life of Dolly*. <https://dolly.roslin.ed.ac.uk/facts/the-life-of-dolly/index.html>
- Uddin, F., Rudin, C. M., & Sen, T. (2020). CRISPR Gene Therapy: Applications, Limitations, and Implications for the Future. *Frontiers in Oncology*, *10*. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.01387>
- Wang, J., Zhang, C., & Feng, B. (2020). The rapidly advancing Class 2 CRISPR-Cas technologies: A customizable toolbox for molecular manipulations. En *Journal of Cellular and Molecular Medicine* (Vol. 24, Número 6, pp. 3256–3270). Blackwell Publishing Inc. <https://doi.org/10.1111/jcmm.15039>
- Wang, M., Glass, Z. A., & Xu, Q. (2017). Non-viral delivery of genome-editing nucleases for gene therapy. En *Gene Therapy* (Vol. 24, Número 3, pp. 144–150). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/gt.2016.72>

- Wei, T. Y., Wu, Y. J., Xie, Q. P., Tang, J. W., Yu, Z. T., Yang, S. B., & Chen, S. X. (2020). CRISPR/Cas9-Based Genome Editing in the Filamentous Fungus *Glarea lozoyensis* and Its Application in Manipulating *gloF*. *ACS Synthetic Biology*, *9*(8), 1968–1977. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.9b00491>
- Wirth, T., Parker, N., & Ylä-Herttuala, S. (2013). History of gene therapy. *Gene*, *525*(2), 162–169. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2013.03.137>
- Wolter, F., Schindele, P., & Puchta, H. (2019). Plant breeding at the speed of light: The power of CRISPR/Cas to generate directed genetic diversity at multiple sites. En *BMC Plant Biology* (Vol. 19, Número 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12870-019-1775-1>
- Xu, Y., & Li, Z. (2020). CRISPR-Cas systems: Overview, innovations and applications in human disease research and gene therapy. En *Computational and Structural Biotechnology Journal* (Vol. 18, pp. 2401–2415). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2020.08.031>
- Yin, L., Zhao, F., Sun, H., Wang, Z., Huang, Y., Zhu, W., Xu, F., Mei, S., Liu, X., Zhang, D., Wei, L., Cen, S., Hu, S., Liang, C., & Guo, F. (2020). CRISPR-Cas13a Inhibits HIV-1 Infection. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, *21*, 147–155. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2020.05.030>
- Yin, T., Luo, J., Huang, D., & Li, H. (2022). Current Progress of Mitochondrial Genome Editing by CRISPR. *Frontiers in Physiology*, *13*. <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.883459>
- Yu, J., Zhou, B., Zhang, S., Yin, H., Sun, L., Pu, Y., Zhou, B., Sun, Y., Li, X., Fang, Y., Wang, L., Zhao, C., Du, D., Zhang, Y., & Xu, H. (2022). Design of a self-driven probiotic-CRISPR/Cas9 nanosystem for sono-immunometabolic cancer therapy. *Nature Communications*, *13*(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-022-35580-z>
- Zetsche, B., Gootenberg, J. S., Abudayyeh, O. O., Slaymaker, I. M., Makarova, K. S., Essletzbichler, P., Volz, S. E., Joung, J., Van Der Oost, J., Regev, A., Koonin, E. V., & Zhang, F. (2015). Cpf1 Is a Single RNA-Guided Endonuclease of a Class 2 CRISPR-Cas System. *Cell*, *163*(3), 759–771. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.09.038>

Zhang, S., Shen, J., Li, D., & Cheng, Y. (2020). Strategies in the delivery of Cas9 ribonucleoprotein for CRISPR/Cas9 genome editing. En *Theranostics* (Vol. 11, Número 2, pp. 614–648). Ivyspring International Publisher. <https://doi.org/10.7150/thno.47007>

Zhen, S., Chen, H., Lu, J., Yang, X., Tuo, X., Chang, S., Tian, Y., & Li, X. (2023). Intravaginal delivery for CRISPR–Cas9 technology: For example, the treatment of HPV infection. *Journal of Medical Virology*, 95(2). <https://doi.org/10.1002/jmv.28552>