

Artículo de revisión/ Revision Article

Sistema CRISPR/Cas: Edición genómica de precisión

Rocío Riveros Maidana¹, Alejandro Méndez Ferreira¹, Nidia Benítez Candia¹, *Eva Nara Pereira²,
*Danilo Fernández Ríos¹

¹Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Biotecnología.
San Lorenzo, Paraguay

²Universidad Nacional de Asunción, Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Biología Molecular y
Biotecnología. San Lorenzo, Paraguay

Cómo referenciar este artículo/
How to reference this article:

Riveros Maidana R, Méndez Ferreira A, Benítez Candia N, Nara Pereira E, Fernández Ríos D. Sistema CRISPR/Cas: Edición genómica de precisión. Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud. 2020; 18(1): 97-107

RESUMEN

La función original de los sistemas CRISPR/Cas es destruir el DNA de virus bacterianos. Este sistema ha evolucionado para identificar y cortar secuencias de diferentes DNA de virus de DNA evitando la infección. En la célula, está compuesto de genes Cas que producen nucleasas guiadas por RNA capaces de cortar el DNA. Si el RNA guía encuentra DNA de un virus con el que se puede emparejar, recluta a la nucleasa Cas9 que lo corta. Este sistema es utilizado *in vitro* para editar genes basándose en la producción de rupturas de doble cadena y su posterior reparación. Actualmente existen varias plataformas para el diseño de RNAs guía, aunque también es posible realizarlo de forma manual. Los componentes del sistema son entregados a la célula mediante un plásmido o una ribonucleoproteína. En esta revisión nos centraremos en la función original de CRISPR/Cas en procariontes y en cómo los investigadores la han modificado para proporcionar nuevas técnicas de edición de genomas. Discutiremos sobre las ventajas de esta nueva técnica, las formas en que podemos utilizarla y algunas de las limitaciones que aún encontramos en su aplicación.

Palabras clave: nucleasas guiadas por RNA, protoespaciador, RNA guía, ruptura de doble cadena.

CRISPR/Cas system: precision genome editing

ABSTRACT

The original function of CRISPR/Cas systems is to destroy the DNA of bacterial viruses. This system has evolved to identify sequences of different DNA viruses and cut them in order to avoid infection. In the cell, the system is made up of Cas genes which produce RNA-guided nucleases capable of cutting DNA. If the guide RNA finds viral DNA with which it can pair up, it recruits the Cas9 nuclease to cut it. This system is used *in vitro* for gene editing, relying on the production of double-strand breaks and their subsequent repair. Currently, there are several platforms for the design of the guide RNA, and it is also possible to design it manually. The components of the system can be delivered to the cell through a plasmid or through a ribonucleoprotein. In this review we will focus on the original function of CRISPR/Cas in prokaryotes, and in how researchers have modified it in order to provide new genome editing techniques. We will discuss the advantages of this new technique, the ways in which it can be used, and some of the limitations found in its application.

Keywords: RNA-guided nucleases, protospacer, sgRNA, double-strand break.

INTRODUCCIÓN

Fecha de recepción: Junio 2019. Fecha de aceptación: agosto 2019

*Autor correspondiente: Danilo Fernández Ríos y Eva Nara Pereira. Email: dfernandez@facen.una.py, megunara@hotmail.com



Este es un artículo publicado en acceso abierto bajo una Licencia Creative Commons

Las nucleasas guiadas por RNA (RGNs) proveen regulación génica con especificidad de secuencia a través de interacciones de apareamiento de bases entre un pequeño RNA guía y un DNA o RNA blanco. Los sistemas RGN, que incluyen a CRISPR/Cas, son extremadamente prometedores como herramientas programables para la ingeniería genética^(1,2).

La tecnología CRISPR/Cas se originó a partir del sistema CRISPR/Cas tipo II que provee a las bacterias de una inmunidad adaptativa a virus y plásmidos⁽³⁾. La proteína Cas9 asociada a CRISPR es una endonucleasa que utiliza una secuencia guía (gRNA) dentro de un RNA dúplex (tracrRNA:crRNA) que, al formar pares de bases con la secuencia blanco en el DNA, le permite introducir un sitio específico de rotura en la doble hebra de DNA⁽⁴⁾. Con el objetivo de optimizar su uso en el laboratorio, el dúplex tracrRNA:crRNA se ha fusionado en una sola molécula de gRNA, llamada RNA guía simple (sgRNA). CRISPR/Cas9 está teniendo un importante impacto en modelos experimentales de genómica funcional^(5,6). El sistema CRISPR/Cas9 realiza una edición precisa y dirigida del genoma de células vivas. La especificidad es la mayor preocupación en el sistema CRISPR/Cas9, debido a que Cas9 puede cortar sitios que no son totalmente complementarios a la secuencia del sgRNA⁽⁷⁾. Con el objeto de optimizar la predicción de los sgRNAs con alta especificidad y reducir la frecuencia relativa de corte de sitios no blanco (*off-target*), se han desarrollado diversos programas informáticos que sirven como herramientas de apoyo⁽⁸⁾. Su aplicación a estudios de genomas completos permitirá un cribado a gran escala de blancos de drogas^(9,10) y otros fenotipos^(11,12), ayudará a generar modelos animales modificados genéticamente que podrán beneficiar a estudios farmacológicos y a la comprensión de enfermedades humanas. Las aplicaciones de CRISPR/Cas9 en plantas y hongos también prometen un cambio en el curso de las investigaciones en el área de la agricultura⁽¹³⁻¹⁶⁾.

CRISPR/Cas es una novedosa técnica de edición de genes y genomas llamada comúnmente CRISPR. En esta revisión nos centraremos en su función original en procariotas y en cómo los investigadores la han modificado para proporcionar nuevas técnicas de edición de genomas. Discutiremos sobre las ventajas de esta nueva técnica, las formas en que podemos utilizarla y algunas de las limitaciones que aún encontramos en su aplicación.

FUNCIÓN DEL LOCUS CRISPR

Las bacterias y arqueas han desarrollado un sistema inmune de defensa adaptativa llamado "Repeticiones Palindrómicas Cortas Agrupadas y Regularmente Interespaciadas" ("Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats", CRISPR)⁽¹⁷⁾. Los sistemas CRISPR/Cas están compuestos de genes organizados en operones⁽¹⁸⁾ y arreglos consistentes en secuencias llamadas espaciadores, interespaciadas por repeticiones idénticas⁽¹⁹⁾. CRISPR protege a los procariotas de la invasión de virus y plásmidos⁽²⁰⁾. Este sistema de defensa recae sobre pequeños RNAs que detectan pequeñas secuencias específicas de ácidos nucleicos foráneos. La inmunidad mediada por CRISPR/Cas ocurre en dos fases: adaptación e inhibición. En la fase de adaptación⁽²¹⁾, las bacterias y arqueas que albergan uno o más loci CRISPR responden a la introducción de material genético, viral o plasmídico, integrando fragmentos cortos de las secuencias foráneas (protoespaciadores) dentro de sus cromosomas en el extremo proximal del arreglo CRISPR⁽²²⁾ (Figura 1).

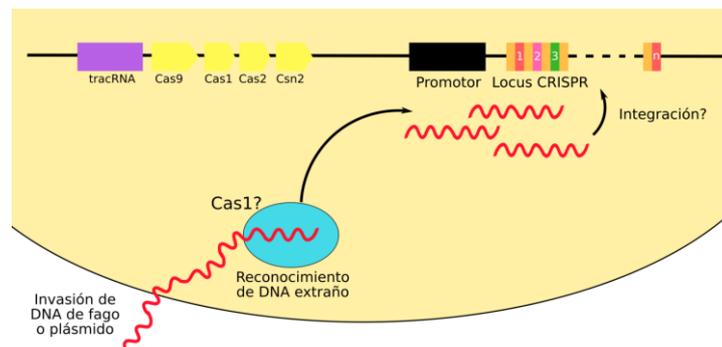


Figura 1: Fase de adaptación. La entrada de un DNA foráneo a una célula a través de la transformación, conjugación o traducción puede llevar a la adquisición de nuevos

espaciadores de DNA por la adaptación del complejo Cas (ensamblaje de proteína desconocida). La imagen no representa exactamente la disposición de los loci.

En la fase de inhibición⁽²³⁾, se transcribe el elemento repetitivo espaciador y el producto se denomina precursor de CRISPR RNA (pre-crRNA). Éste luego es cortado enzimáticamente para producir CRISPR RNA (crRNA) cortos, los cuales pueden aparearse con secuencias protoespaciadoras complementarias al invasor viral o plasmídico. El blanco de reconocimiento para los crRNAs dirige el corte de genes foráneos mediante el uso de nucleasas Cas que funcionan en complejos con los crRNAs (Figura 2).

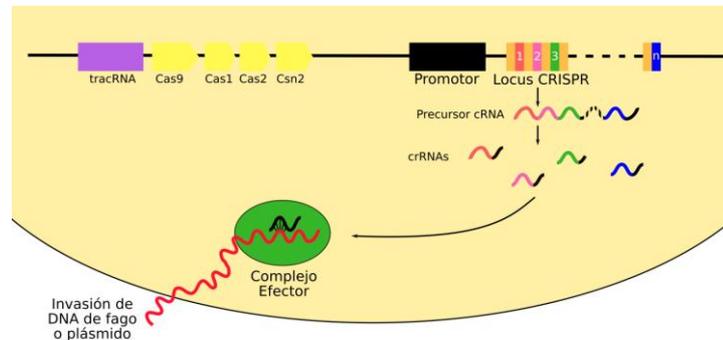


Figura 2: Fase de inhibición. El complejo efector está unido a un crRNA producido por la transcripción del locus CRISPR y el posterior procesamiento. El complejo efector se aparea con una región de ácido nucleico foráneo (por apareamiento perfecto) y allí inhibe al material genético invasivo y lo destruye mediante su corte. La imagen no representa exactamente la disposición de los loci.

El sistema CRISPR mejor caracterizado y utilizado en edición genómica es el de tipo II⁽²⁴⁾. Está compuesto por la nucleasa Cas9, que utiliza como guía a un crRNA que se aparea con el llamado RNA trans activador (tracrRNA), el cual cumple una función estructural⁽²⁵⁾. Estos RNAs son considerados el RNA guía (gRNA) y forman un complejo con la proteína Cas9. Cada unidad de crRNA contiene una secuencia guía de 20 nucleótidos y una repetición parcial directa, donde la primera dirige a Cas9 a un blanco de 20 nucleótidos a través del apareamiento de bases de Watson-Crick⁽²⁶⁾. Cas9 posee los dominios catalíticos RuvC y HNH, además del dominio de interacción con el motivo protoespaciador adyacente (PAM). Cas9 realiza cortes de doble hebra (DSB) utilizando los dominios RuvC y HNH (Figura 3 y Figura 4). Como se ha dicho al inicio, el crRNA y tracrRNA se han fusionado para su uso en el laboratorio, dando origen al sgRNA⁽²⁷⁾.

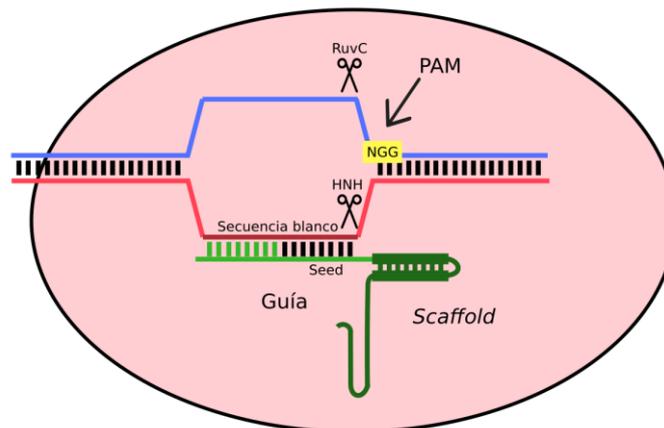


Figura 3: Esquema de la nucleasa Cas9 guiada por RNA. Cas9 (en rosado) es apuntada al DNA genómico a través de un sgRNA que consiste en una secuencia guía de 20 nucleótidos y una secuencia *scaffold*. La secuencia guía se aparea con el DNA blanco, directamente aguas arriba de un motivo adyacente 5'-NGG requisito (PAM). Cas9 media una ruptura de doble hebra alrededor de 3 pb aguas arriba del PAM.

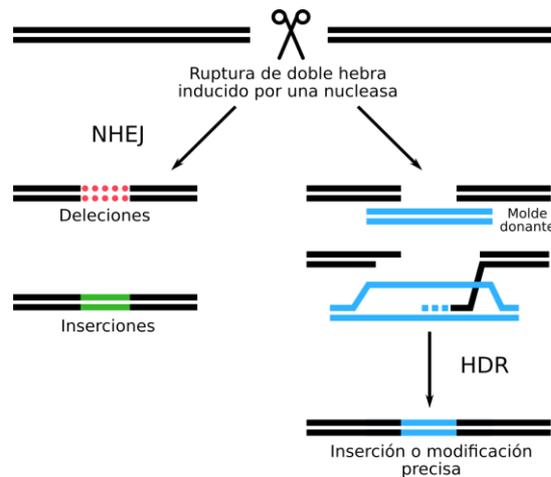


Figura 4: Edición génica inducida por una nucleasa. Las rupturas de doble hebra (DSB) inducidas por una nucleasa pueden ser reparadas por vías de unión de extremos no homólogos (NHEJ) o de reparación dirigida por homología (HDR). Una reparación imprecisa mediada por NHEJ puede producir mutaciones de inserción y/o deleción de longitud variable en el sitio de la ruptura de doble hebra⁽²⁸⁾.

Consideraciones prácticas para la implementación de la tecnología CRISPR/Cas

Debido al rápido progreso en el campo, los usuarios potenciales se encontrarán con una variedad de opciones acerca de cómo implementar la tecnología CRISPR/Cas. Discutiremos algunos parámetros a considerar cuando se desea implementar esta tecnología:

Elección de sitios blanco de sgRNA

Una de las ventajas principales del sistema CRISPR/Cas9 es su simplicidad, ya que es posible desarrollar la técnica en pasos simples. Primeramente, se debe caracterizar el problema de investigación y a partir de allí seleccionar el gen blanco. Una vez elegido el gen con el que se trabajará, se pueden seguir secuencialmente los pasos detallados en la Figura 5.

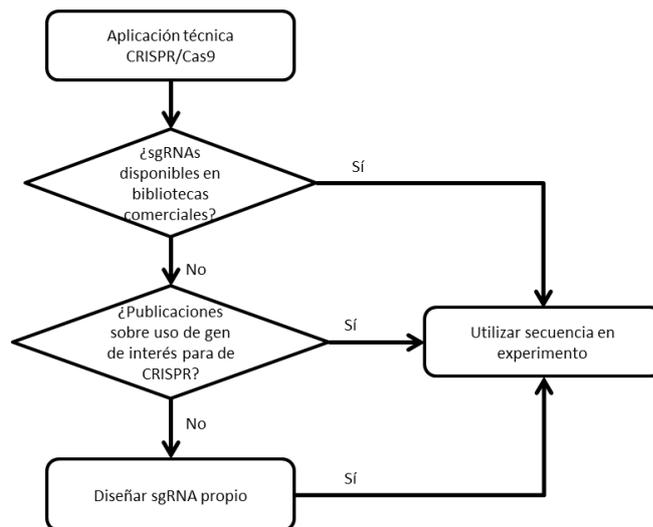


Figura 5: Pasos para la aplicación de la técnica CRISPR/Cas9. Primeramente, es aconsejable buscar secuencias sgRNA diseñadas anteriormente en bibliotecas comerciales. Si esta opción no está disponible, se procede a publicaciones donde se ha utilizado el gen de interés para un ensayo con CRISPR; allí los autores habrán publicado el sgRNA que han empleado en el trabajo y los resultados obtenidos. Finalmente, si no se

encuentra una secuencia sgRNA a través de estas opciones, se debe diseñar un sgRNA propio.

En los pasos iniciales del diseño de un sgRNA propio, se deben tener en cuenta cuestiones básicas respecto al gen blanco, como la selección de secciones sin SNPs (polimorfismos de un solo nucleótido), la elección de segmentos específicos del gen de interés en el caso de que ese gen sea parte de una familia génica, y finalmente la utilización de secuencias de genes que especifiquen exactamente la localización de cada exón. Es posible que al utilizar secuencias de mRNA accidentalmente se diseñe el sgRNA en una región de unión exón-exón, la cual no existe en la secuencia de DNA. Se recomienda elegir las secuencias entre los primeros exones, después del codón de inicio⁽²⁹⁾.

Luego de seleccionar el gen blanco, se procede a diseñar el sgRNA. Actualmente existen numerosos sitios web que lo diseñan⁽³⁰⁾ y evalúan su especificidad mediante análisis de BLAST. Debido a que estos recursos utilizan en sus bases de datos genomas de sus organismos de interés, es importante verificar si el organismo de interés del investigador se encuentra dentro de su base de datos.

Si no es posible diseñar el sgRNA con alguno de estos recursos, se debe realizar el diseño *de novo*. Para ello, hay que seguir una serie de pasos generales, detallados en el Cuadro 1.

Cuadro 1: Pasos a seguir para el diseño de un sgRNA.

- A. Seleccionar una secuencia N₂₀NGG inmediatamente después del codón de inicio y entre los primeros exones.
- B. Tener en cuenta que cualquiera de las dos cadenas puede ser un sitio blanco del sgRNA.
- C. Evaluar las estructuras secundarias y el contenido de "GC". Este paso puede ser realizado con programas como "Generunner"⁽³¹⁾.
- D. Evaluar la especificidad del sgRNA mediante BLAST.

Entrega de los componentes de CRISPR/Cas

Las RGNs han sido utilizadas en un amplio rango de tipos celulares y organismos utilizando una variedad de métodos de entrega. En cultivos de células de mamíferos los investigadores han usado electroporación⁽³²⁾, nucleofección⁽³³⁾, inyección de virus recombinante asociado a adenovirus⁽³⁴⁾, y transfección mediada por lipofectamina de plásmidos no replicativos que expresan Cas9 en forma transiente, y sgRNAs⁽²⁸⁾.

También han sido empleados vectores lentivirales para expresar Cas9 y/o sgRNAs en forma constitutiva en cultivos celulares de humanos⁽³⁵⁾ y ratones⁽³⁶⁾. Moléculas de RNA⁽³⁷⁾ y/o plásmidos de DNA transcriptos *in vitro* han sido inyectados directamente en embriones de peces cebra⁽³⁸⁾, moscas de la fruta⁽³⁹⁾, ratones⁽⁴⁰⁾ y ratas⁽⁴¹⁾. Se ha utilizado con éxito Cas9 en múltiples especies de plantas como trigo, arroz, sorgo, tabaco y *Arabidopsis* con un amplio rango de métodos de entrega; incluyendo transformación de protoplastos mediada por polietilenglicol, transferencia en embriones, y tejido de hoja mediada por *Agrobacterium tumefaciens* o bombardeo de células del callo con plásmidos de DNA⁽⁴²⁾.

Los componentes de CRISPR/Cas también pueden ser entregados mediante complejos de ribonucleoproteínas (Cas9 RNPs), consistentes en la proteína Cas9 purificada en conjunto con el sgRNA. Son ensambladas *in vitro* y pueden ser entregadas directamente⁽⁴³⁾ a la célula mediante electroporación u otras técnicas estándar de transfección (Figura 6).

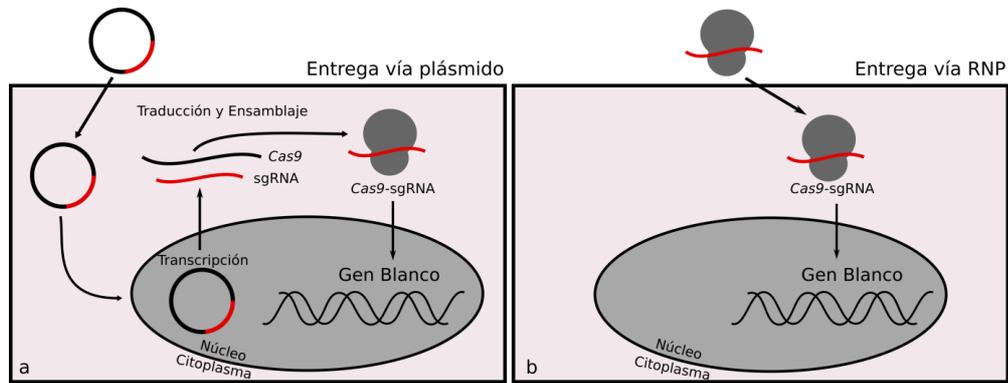


Figura 6: Métodos de entrega de los componentes del sistema CRISPR/Cas9. a. El sgRNA y la nucleasa Cas9 pueden ser entregadas mediante un plásmido, el cual utiliza la maquinaria celular para producir los componentes y luego realizar la edición génica. b. El sgRNA y la nucleasa Cas9 son sintetizadas *in vitro* y pueden ser entregados directamente a la célula mediante electroporación u otras técnicas de transfección⁽¹⁴⁾.

Aplicaciones de CRISPR/Cas

CRISPR/Cas ha revolucionado los laboratorios de todo el mundo por sus innovadoras aplicaciones: permite realizar análisis sistemáticos de funciones de genes de células de mamíferos, estudios de rearrreglos y progresión de cánceres y otras enfermedades, potencialmente permite corregir mutaciones responsables de desórdenes hereditarios⁽⁴⁴⁾, e inclusive puede ser utilizado para diagnósticos en biomedicina⁽⁴⁵⁾. Además, ha sido exitosamente empleado para corregir las mutaciones causantes de la fibrosis quística y la β -talasemia en líneas celulares humanas^(46,47). También puede utilizarse para eliminar la malaria creando mosquitos genéticamente modificados. Sin embargo, su implementación para eliminar ciertas especies invasivas o para alterar ciertas poblaciones salvajes (gene drive)⁽⁴⁸⁾ ha generado mucha controversia con respecto a las consecuencias ambientales de la eliminación de especies⁽⁴⁹⁻⁵¹⁾. También es prometedora en el desarrollo de la investigación en el área de la agricultura; en particular con CRISPR/Cas9, se han editado exitosamente los genomas de *Arabidopsis*, tabaco, arroz, trigo, maíz, y tomate⁽⁵²⁾. La identificación de CRISPR/Cas subraya la forma en que muchas invenciones han avanzado en la biología molecular a partir de la investigación básica de los mecanismos naturales de la replicación del DNA, la reparación, y la defensa contra los virus. Una vez que fue comprendido el mecanismo subyacente a su funcionamiento, se pudieron visualizar sus posibles aplicaciones en biología molecular y genética.

Desafíos actuales en el uso de la tecnología CRISPR/Cas

Debido a su versatilidad, CRISPR/Cas9 se ha convertido en el método más popular de edición génica, triplicando en el 2015 la cantidad de publicaciones relacionadas en comparación a otras técnicas de edición génica como TALEN y ZNF⁽⁵³⁾. Aun así, se presentan aspectos que siguen siendo explorados y representan desafíos⁽⁵⁴⁾.

Se avanza hacia la comprensión de los diferentes subtipos del sistema CRISPR/Cas y el uso de complejos efectores más pequeños (como el Cpf1)⁽⁵⁵⁻⁵⁷⁾. Por otro lado, la entrega de los componentes de CRISPR/Cas aún sigue siendo un desafío. En el caso específico de los vectores virales, preferidos debido a su baja inmunogenicidad, el gran tamaño de los efectores Cas dificulta su empaquetamiento dentro del vector⁽⁵⁸⁾. Existe un gran interés en desarrollar estrategias de entrega no virales para introducir los componentes de CRISPR/Cas en las células *in vivo*. Se han probado compuestos de nanopartículas lipídicas sólidas, lipofectamina, nanopartículas de oro y polímeros catiónicos como vehículos de entrega no viral de Cas9, y el sgRNA ha sido capaz de inactivar genes en forma eficiente *in vivo* en una variedad de tejidos. Las nanopartículas permiten tratamientos acumulativos repetitivos, por lo que con un pequeño porcentaje de genes editados en cada tratamiento, el efecto positivo total puede incrementar con el número de aplicaciones. Si bien esto parece prometedor, los vehículos de entrega de CRISPR/Cas9 por medio de nanopartículas necesitan ser optimizados con respecto a la biodegradabilidad y el acceso desde la corriente sanguínea hasta el tejido blanco^(59,60). Se han observado avances significativos en los últimos años para mitigar los defectos asociados con los abordajes de entrega por virus, basados en mRNA, plásmidos y proteínas para el sistema CRISPR/Cas9. A pesar de ello, cada plataforma aún enfrenta

diferentes barreras en la traducción. Sin embargo, los avances actuales han llevado al desarrollo de vehículos de entrega con capacidades sin precedentes superando muchos obstáculos que alguna vez estuvieron escondidos en la capacidad traduccional de este sistema⁽⁶¹⁾.

En resumen, esta tecnología puede utilizarse para la edición genética en microorganismos y plantas, y en células humanas para la erradicación de enfermedades. Debido a su gran alcance, tanto en investigaciones y en desarrollo de nuevos productos en varios sectores como la industria agro-ganadera y la salud humana, se produjo una atención particular a nivel mundial sobre las consecuencias que puede tener en el ambiente⁽⁶²⁾, la política, la economía⁽⁶³⁾ y la sociedad⁽⁶⁴⁻⁶⁷⁾. Si bien es de gran importancia conocer cómo funciona y sus posibles aplicaciones, no se debe dejar de lado uno de los factores que determina su viabilidad: la regulación de la tecnología⁽⁶⁸⁻⁷⁰⁾. Para poder seguir impulsando la biotecnología mediante la investigación básica y el desarrollo de nuevas tecnologías, es necesario definir y diferenciar las técnicas de edición genética de otras, como la transgénesis, dentro del ámbito regulatorio. Con esto se lograría evitar inconvenientes innecesarios dentro del área regulatoria-legal⁽⁷¹⁾ para así poder resolver problemas actuales o desarrollar soluciones más eficientes, sin dejar de lado la ética en la investigación y la bioseguridad que conlleva una tecnología de alto impacto. Si bien los mecanismos más adecuados para regular esta tecnología están aún en discusión, es importante abordar este problema desde varias perspectivas como la social, política, económica y ambiental para lograr aprovecharla al máximo, de manera integral y sustentable.

Fuentes de financiación: Universidad Nacional de Asunción.

Declaración de conflicto de intereses: Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bisaria N, Jarmoskaite I, Herschlag D. Lessons from Enzyme Kinetics Reveal Specificity Principles for RNA-Guided Nucleases in RNA Interference and CRISPR-Based Genome Editing. *Cell Syst* [Internet]. enero de 2017;4(1):21-9. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2405471216304203>
2. Patmanathan SN, Gnanasegaran N, Lim MN, Husaini R, Fakiruddin KS, Zakaria Z. CRISPR/Cas9 in Stem Cell Research: Current Application and Future Perspective. *Curr Stem Cell Res Ther* [Internet]. 1 de octubre de 2018;13(8):632-44. Disponible en: <http://www.eurekaselect.com/163035/article>
3. Chylinski K, Makarova KS, Charpentier E, Koonin E V. Classification and evolution of type II CRISPR-Cas systems. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2 de junio de 2014;42(10):6091-105. Disponible en: <http://academic.oup.com/nar/article/42/10/6091/2434503/Classification-and-evolution-of-type-II-CRISPRCas>
4. Chylinski K, Le Rhun A, Charpentier E. The tracrRNA and Cas9 families of type II CRISPR-Cas immunity systems. *RNA Biol* [Internet]. 5 de mayo de 2013;10(5):726-37. Disponible en: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.4161/rna.24321>
5. Knott GJ, Doudna JA. CRISPR-Cas guides the future of genetic engineering. *Science* (80-) [Internet]. 31 de agosto de 2018;361(6405):866-9. Disponible en: <http://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.aat5011>
6. Barrangou R, Horvath P. A decade of discovery: CRISPR functions and applications. *Nat Microbiol* [Internet]. 5 de julio de 2017;2(7):17092. Disponible en: <http://www.nature.com/articles/nmicrobiol201792>
7. Kimberland ML, Hou W, Alfonso-Pecchio A, Wilson S, Rao Y, Zhang S, et al. Strategies for controlling CRISPR/Cas9 off-target effects and biological variations in mammalian genome editing experiments. *J Biotechnol* [Internet]. octubre de 2018;284:91-101. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168165618306060>
8. Lone BA, Karna SKL, Ahmad F, Shahi N, Pokharel YR. CRISPR/Cas9 System: A Bacterial Tailor for Genomic Engineering. *Genet Res Int* [Internet]. 18 de septiembre de 2018;2018:1-17. Disponible en: <https://www.hindawi.com/journals/gri/2018/3797214/>
9. Yuan N-N, Cai C-Z, Wu M-Y, Zhu Q, Su H, Li M, et al. Canthin-6-One Accelerates Alpha-Synuclein Degradation by Enhancing UPS Activity: Drug Target Identification by CRISPR-Cas9 Whole Genome-Wide Screening Technology.

- Front Pharmacol [Internet]. 28 de enero de 2019;10. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fphar.2019.00016/full>
10. Kurata M, Yamamoto K, Moriarity BS, Kitagawa M, Largaespada DA. CRISPR/Cas9 library screening for drug target discovery. J Hum Genet [Internet]. 20 de febrero de 2018;63(2):179-86. Disponible en: <http://www.nature.com/articles/s10038-017-0376-9>
 11. Chao T, Liu Z, Zhang Y, Zhang L, Huang R, He L, et al. Precise and Rapid Validation of Candidate Gene by Allele Specific Knockout With CRISPR/Cas9 in Wild Mice. Front Genet [Internet]. 19 de febrero de 2019;10. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fgene.2019.00124/full>
 12. Thomsen EA, Mikkelsen JG. CRISPR-Based Lentiviral Knockout Libraries for Functional Genomic Screening and Identification of Phenotype-Related Genes. En: Luo Y, editor. CRISPR Gene Editing Methods in Molecular Biology [Internet]. New York: Humana Press; 2019. p. 343-57. Disponible en: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-9170-9_21
 13. Deveau H, Garneau JE, Moineau S. CRISPR/Cas System and Its Role in Phage-Bacteria Interactions. Annu Rev Microbiol [Internet]. 13 de octubre de 2010;64(1):475-93. Disponible en: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.micro.112408.134123>
 14. Doudna JA, Charpentier E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. Science (80-) [Internet]. 28 de noviembre de 2014;346(6213):1258096-1258096. Disponible en: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1258096>
 15. Krebs JE, Goldstein ES, Kilpatrick ST. Bacteria contain regulator RNAs. En: Genes XI. Burlington, MA: Learning, Jones & Bartlett; 2014. p. 878-81.
 16. Østerberg JT, Xiang W, Olsen LI, Edenbrandt AK, Vedel SE, Christiansen A, et al. Accelerating the Domestication of New Crops: Feasibility and Approaches. Trends Plant Sci [Internet]. mayo de 2017;22(5):373-84. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1360138517300158>
 17. Makarova KS, Wolf YI, Koonin E V. Classification and Nomenclature of CRISPR-Cas Systems: Where from Here? Cris J [Internet]. octubre de 2018;1(5):325-36. Disponible en: <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/crispr.2018.0033>
 18. Le Rhun A, Escalera-Maurer A, Bratovič M, Charpentier E. CRISPR-Cas in *Streptococcus pyogenes*. RNA Biol [Internet]. 3 de abril de 2019;16(4):380-9. Disponible en: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/15476286.2019.1582974>
 19. Yair Y, Gophna U. Repeat modularity as a beneficial property of multiple CRISPR-Cas systems. RNA Biol [Internet]. 3 de abril de 2019;16(4):585-7. Disponible en: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/15476286.2018.1474073>
 20. Faure G, Shmakov SA, Yan WX, Cheng DR, Scott DA, Peters JE, et al. CRISPR-Cas in mobile genetic elements: counter-defence and beyond. Nat Rev Microbiol [Internet]. 5 de junio de 2019; Disponible en: <http://www.nature.com/articles/s41579-019-0204-7>
 21. Hille F, Richter H, Wong SP, Bratovič M, Ressel S, Charpentier E. The Biology of CRISPR-Cas: Backward and Forward. Cell [Internet]. marzo de 2018;172(6):1239-59. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867417313831>
 22. McGinn J, Marraffini LA. Molecular mechanisms of CRISPR-Cas spacer acquisition. Nat Rev Microbiol [Internet]. 31 de enero de 2019;17(1):7-12. Disponible en: <http://www.nature.com/articles/s41579-018-0071-7>
 23. Sharipova MR, Balaban NP, Mardanova AM, Toymontseva AA, Baranova DS. Effect of nucleases on bacteria infected with bacteriophages. Biol Bull [Internet]. 4 de marzo de 2017;44(2):137-43. Disponible en: <http://link.springer.com/10.1134/S1062359017020170>
 24. Makarova KS, Zhang F, Koonin E V. SnapShot: Class 2 CRISPR-Cas Systems. Cell [Internet]. enero de 2017;168(1-2):328-328.e1. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867416317548>
 25. Haurwitz RE, Jinek M, Wiedenheft B, Zhou K, Doudna JA. Sequence- and Structure-Specific RNA Processing by a CRISPR Endonuclease. Science (80-) [Internet]. 10 de septiembre de 2010;329(5997):1355-8. Disponible en: <http://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.1192272>
 26. Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. Nat Protoc [Internet]. 24 de octubre de 2013;8(11):2281-308. Disponible en: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nprot.2013.143>
 27. Viliód Vieira G, Nerry T, Magalhães Arruda L. Visão geral do mecanismo básico de ação. En: Campos Pereira T,

- editor. Introdução à técnica de CRISPR. Sociedade Brasileira de Genética; 2016. p. 39-49.
28. Sander JD, Joung JK. CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nat Biotechnol* [Internet]. 2 de abril de 2014;32(4):347-55. Disponible en: <http://www.nature.com/articles/nbt.2842>
 29. CBAB. Introdução às técnicas de RNAi e CRISPR. En: Campos Pereira T, editor. Curso teórico-práctico internacional del Centro Brasileiro Argentino de Biotecnologia (CBAB). Ribeirão Preto, Brasil; 2018.
 30. Brazelton VA, Zarecor S, Wright DA, Wang Y, Liu J, Chen K, et al. A quick guide to CRISPR sgRNA design tools. *GM Crops Food* [Internet]. 2 de octubre de 2015 [citado 12 de mayo de 2019];6(4):266-76. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5033207/>
 31. Buquicchio F, Spruyt M. Gene Runner [Internet]. *Gene Runner*; 2018. Disponible en: <http://www.generunner.net/>
 32. Ding Q, Regan SN, Xia Y, Oostrom LA, Cowan CA, Musunuru K. Enhanced Efficiency of Human Pluripotent Stem Cell Genome Editing through Replacing TALENs with CRISPRs. *Cell Stem Cell* [Internet]. abril de 2013;12(4):393-4. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S193459091300101X>
 33. Fu Y, Foden JA, Khayter C, Maeder ML, Reyon D, Joung JK, et al. High-frequency *off-target* mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nat Biotechnol* [Internet]. 23 de septiembre de 2013;31(9):822-6. Disponible en: <http://www.nature.com/articles/nbt.2623>
 34. Xu L, Gao Y, Lau YS, Han R. Adeno-Associated Virus-Mediated Delivery of CRISPR for Cardiac Gene Editing in Mice. *J Vis Exp* [Internet]. 2 de agosto de 2018;(138). Disponible en: <https://www.jove.com/video/57560/adeno-associated-virus-mediated-delivery-crispr-for-cardiac-gene>
 35. Tagliafierro L, Ilich E, Moncalvo M, Gu J, Sriskanda A, Grenier C, et al. Lentiviral Vector Platform for the Efficient Delivery of Epigenome-editing Tools into Human Induced Pluripotent Stem Cell-derived Disease Models. *J Vis Exp* [Internet]. 29 de marzo de 2019;(145). Disponible en: <https://www.jove.com/video/59241/lenti-viral-vector-platform-for-efficient-delivery-epigenome-editing>
 36. Estêvão D, Rios Costa N, da Costa RG, Medeiros R. CRISPR-Cas9 therapies in experimental mouse models of cancer. *Futur Oncol* [Internet]. agosto de 2018;14(20):2083-95. Disponible en: <https://www.futuremedicine.com/doi/10.2217/fon-2018-0028>
 37. Laroche S. CRISPR-Cas goes RNA. *Nat Methods* [Internet]. 1 de mayo de 2018;15(5):312-312. Disponible en: <http://www.nature.com/articles/nmeth.4681>
 38. Xin Y, Duan C. Microinjection of Antisense Morpholinos, CRISPR/Cas9 RNP, and RNA/DNA into Zebrafish Embryos. En 2018. p. 205-11. Disponible en: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-7665-2_18
 39. Ren X, Holsteens K, Li H, Sun J, Zhang Y, Liu L-P, et al. Genome editing in *Drosophila melanogaster*: from basic genome engineering to the multipurpose CRISPR-Cas9 system. *Sci China Life Sci* [Internet]. 1 de mayo de 2017;60(5):476-89. Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/s11427-017-9029-9>
 40. Wang G, Chow RD, Ye L, Guzman CD, Dai X, Dong MB, et al. Mapping a functional cancer genome atlas of tumor suppressors in mouse liver using AAV-CRISPR-mediated direct *in vivo* screening. *Sci Adv* [Internet]. 28 de febrero de 2018;4(2):eaao5508. Disponible en: <http://advances.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/sciadv.aao5508>
 41. Kaneko T, Sakuma T, Yamamoto T, Mashimo T. Simple knockout by electroporation of engineered endonucleases into intact rat embryos. *Sci Rep* [Internet]. 1 de mayo de 2015;4(1):6382. Disponible en: <http://www.nature.com/articles/srep06382>
 42. Perez Rojo F, Nyman RKM, Johnson AAT, Navarro MP, Ryan MH, Erskine W, et al. CRISPR-Cas systems: ushering in the new genome editing era. *Bioengineered* [Internet]. 2018;9(1):214-21. Disponible en: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/21655979.2018.1470720>
 43. Addgene. CRISPR 101: A Desktop Resource [Internet]. 2.a ed. www.addgene.org; 2017. Disponible en: <https://info.addgene.org/download-addgenes-ebook-crispr-101-2nd-edition>
 44. Myhrvold C, Freije CA, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Metsky HC, Durbin AF, et al. Field-deployable viral diagnostics using CRISPR-Cas13. *Science* (80-). 2018;360(6387):444-8.
 45. Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Kellner MJ, Joung J, Collins JJ, Zhang F. Multiplexed and portable nucleic acid detection platform with Cas13, Cas12a, and Csm6. *Science* (80-) [Internet]. 27 de abril de 2018 [citado 21 de mayo de 2019];360(6387):439-44. Disponible en:

- <https://science.sciencemag.org/content/360/6387/439>
46. Xie F, Ye L, Chang JC, Beyer AI, Wang J, Muench MO, et al. Seamless gene correction of β -thalassemia mutations in patient-specific iPSCs using CRISPR/Cas9 and piggyBac. *Genome Res* [Internet]. septiembre de 2014;24(9):1526-33. Disponible en: <http://genome.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/gr.173427.114>
 47. Firth AL, Menon T, Parker GS, Qualls SJ, Lewis BM, Ke E, et al. Functional Gene Correction for Cystic Fibrosis in Lung Epithelial Cells Generated from Patient iPSCs. *Cell Rep* [Internet]. septiembre de 2015;12(9):1385-90. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211124715008529>
 48. Burt A, Crisanti A. Gene Drive: Evolved and Synthetic. *ACS Chem Biol* [Internet]. 16 de febrero de 2018;13(2):343-6. Disponible en: <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/acscchembio.7b01031>
 49. Evans SW, Palmer MJ. Anomaly handling and the politics of gene drives. *J Responsible Innov* [Internet]. 24 de enero de 2018;5(sup1):S223-42. Disponible en: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/23299460.2017.1407911>
 50. Novak BJ, Maloney T, Phelan R. Advancing a New Toolkit for Conservation: From Science to Policy. *Cris J* [Internet]. febrero de 2018;1(1):11-5. Disponible en: <http://online.liebertpub.com/doi/10.1089/crispr.2017.0019>
 51. Kohl PA, Brossard D, Scheufele DA, Xenos MA. Public views about gene editing wildlife for conservation. *Conserv Biol* [Internet]. 8 de marzo de 2019; Disponible en: <http://doi.wiley.com/10.1111/cobi.13310>
 52. Benítez Candia N, Riveros Maidana R, Méndez Ferreira A, Fernández Ríos D. Plant breeding in the age of genome editing. *Steviana*. 2018;10(1 (supl)):20.
 53. ELSEVIER. CRISPR Infographic [Internet]. *Research Intelligence*. 2016 [citado 12 de diciembre de 2018]. Disponible en: <https://www.elsevier.com/research-intelligence/campaigns/crispr>
 54. Koonin E V. Open questions: CRISPR biology. *BMC Biol* [Internet]. 24 de diciembre de 2018;16(1):95. Disponible en: <https://bmcbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12915-018-0565-9>
 55. Pallarès Masmitjà M, Knödseder N, Güell M. CRISPR-gRNA Design. En 2019. p. 3-11. Disponible en: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-9170-9_1
 56. Fu BXH, Smith JD, Fuchs RT, Mabuchi M, Curcuru J, Robb GB, et al. Target-dependent nickase activities of the CRISPR-Cas nucleases Cpf1 and Cas9. *Nat Microbiol* [Internet]. 4 de mayo de 2019;4(5):888-97. Disponible en: <http://www.nature.com/articles/s41564-019-0382-0>
 57. Chow RD, Wang G, Ye L, Codina A, Kim HR, Shen L, et al. *In vivo* profiling of metastatic double knockouts through CRISPR-Cpf1 screens. *Nat Methods* [Internet]. 8 de mayo de 2019;16(5):405-8. Disponible en: <http://www.nature.com/articles/s41592-019-0371-5>
 58. Adli M. The CRISPR tool kit for genome editing and beyond. *Nature Communications*. 2018.
 59. Alton EFWF, Boyd AC, Davies JC, Gill DR, Griesenbach U, Harrison PT, et al. Genetic medicines for CF: Hype versus reality. *Pediatr Pulmonol* [Internet]. octubre de 2016;51(S44):S5-17. Disponible en: <http://doi.wiley.com/10.1002/ppul.23543>
 60. Conboy I, Murthy N, Etienne J, Robinson Z. Making gene editing a therapeutic reality. *F1000Research* [Internet]. 21 de diciembre de 2018;7:1970. Disponible en: <https://f1000research.com/articles/7-1970/v1>
 61. Luther DC, Lee YW, Nagaraj H, Scaletti F, Rotello VM. Delivery approaches for CRISPR/Cas9 therapeutics *in vivo*: advances and challenges. *Expert Opin Drug Deliv* [Internet]. 2 de septiembre de 2018;15(9):905-13. Disponible en: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/17425247.2018.1517746>
 62. Pineda M, Lear A, Collins JP, Kiani S. Safe CRISPR: Challenges and Possible Solutions. *Trends Biotechnol* [Internet]. abril de 2019;37(4):389-401. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167779918302634>
 63. Bartkowski B, Theesfeld I, Pirscher F, Timaeus J. Snipping around for food: economic, ethical and policy implications of CRISPR/Cas genome editing. *Geoforum* [Internet]. noviembre de 2018;96:172-80. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0016718518302215>
 64. Dayan F. CRISPR Cas-9 genome editing and Islam: a religious perspective. *Bangladesh J Med Sci* [Internet]. 30 de diciembre de 2018;18(1):7-13. Disponible en: <https://banglajol.info/index.php/BJMS/article/view/39540>
 65. Brokowski C. Do CRISPR Germline Ethics Statements Cut It? *Cris J* [Internet]. abril de 2018;1(2):115-25. Disponible en:

- <http://www.liebertpub.com/doi/10.1089/crispr.2017.0024>
66. Shew AM, Nalley LL, Snell HA, Nayga RM, Dixon BL. CRISPR versus GMOs: Public acceptance and valuation. *Glob Food Sec* [Internet]. diciembre de 2018;19:71-80. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211912418300877>
 67. Isa NM, Zulkifli NA, Man S. Islamic Perspectives on CRISPR/Cas9-Mediated Human Germline Gene Editing: A Preliminary Discussion. *Sci Eng Ethics* [Internet]. 4 de marzo de 2019; Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/s11948-019-00098-z>
 68. Eş I, Gavahian M, Marti-Quijal FJ, Lorenzo JM, Mousavi Khaneghah A, Tsatsanis C, et al. The application of the CRISPR-Cas9 genome editing machinery in food and agricultural science: Current status, future perspectives, and associated challenges. *Biotechnol Adv* [Internet]. mayo de 2019;37(3):410-21. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0734975019300254>
 69. Cathomen T, Schüle S, Schübler-Lenz M, Abou-El-Enein M. The Human Genome Editing Race: Loosening Regulatory Standards for Commercial Advantage? *Trends Biotechnol* [Internet]. febrero de 2019;37(2):120-3. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167779918301690>
 70. Whelan AI, Lema MA. Regulatory framework for gene editing and other new breeding techniques (NBTs) in Argentina. *GM Crops Food* [Internet]. octubre de 2015 [citado 6 de junio de 2016];6(4):253-65. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1080/21645698.2015.1114698>
 71. Eriksson D, Kershen D, Nepomuceno A, Pogson BJ, Prieto H, Purnhagen K, et al. A comparison of the EU regulatory approach to directed mutagenesis with that of other jurisdictions, consequences for international trade and potential steps forward. *New Phytol* [Internet]. 16 de junio de 2019;222(4):1673-84. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/nph.15627>