

EDICIÓN GÉNICA CON CRISPR: DE LAS SALINAS DE SANTA POLA (ALICANTE) A LA LUCHA CONTRA EL CORONAVIRUS SARS-CoV2 PASANDO POR LOS PRIMEROS HUMANOS EDITADOS GENÉTICAMENTE.

por ENRIQUE VIGUERA MÍNGUEZ¹ Y MIGUEL ÁNGEL LÓPEZ CARRASCO²

¹PROFESOR TITULAR DE GENÉTICA. UNIVERSIDAD DE MÁLAGA. VOCAL DE LA SEBBM.

²ESTUDIANTE GRADO EN BIOQUÍMICA, ESPECIALIDAD BIOTECNOLOGÍA, UNIVERSIDAD DE MÁLAGA.

EVIGUERA@UMA.ES

La técnica de edición genética CRISPR-Cas está suponiendo una auténtica revolución científica. Su utilización permite eliminar, adicionar, o reemplazar la información genética tanto en ensayos *in vitro* como *ex vivo* e *in vivo*. La lista de posibilidades y aplicaciones en biología, biotecnología y biomedicina es muy extensa: Inactivación de un gen, sustitución de una secuencia de DNA por otra, corrección de un cambio específico en el DNA responsable de la aparición de una determinada enfermedad, diseño de sistemas de diagnóstico con una sensibilidad impensable hasta la fecha, posibilidad de editar no sólo el DNA sino también el RNA, codificación de mensajes ocultos en el genoma de una bacteria... El investigador Lluís Montoliu, pionero en el uso de estas herramientas en España, nos dice en su libro «Editando genes: recorta, pega y colorea» que «el límite de las aplicaciones derivadas de la edición genética con las herramientas CRISPR está en la imaginación de los investigadores». Desde el año 2013 hasta ahora han aparecido casi 18.000 publicaciones científicas que utilizan el sistema CRISPR y han surgido múltiples variantes de edición genética basada en CRISPR, como los sistemas SHERLOCK, CARMEN, DETECTR y REPAIR.

Herramientas tradicionales de modificación genética

La primera herramienta de modificación genética fue desarrollada en la década de los 80 del pasado siglo por Mario Capecchi y Oliver Smithies (Premios Nobel 2007) basándose en la recombinación homóloga, un sistema de reparación del DNA por homología de secuencia que poseen las células, tanto eucariotas como procariotas, aunque con maquinarias proteicas diferentes. Este proceso, conservado a lo largo de la evolución, fue identificado en bacterias por el Premio Nobel de 1958 Joshua Lederberg. Capecchi demostró en células de mamíferos que podría darse un intercambio de material genético entre un fragmento de DNA introducido de manera exógena y los cromosomas celulares por dicho mecanismo. De esta forma, se abrió la puerta a la posibilidad de reparar genes defectuosos mediante recombinación homóloga con el DNA introducido. Así, si queremos corregir una mutación específica en un gen de una célula, podemos construir un vector (plásmido) que posea dicho gen con el cambio génico deseado, mientras que el resto de la secuencia permanece idéntica. De manera estocástica, se producirá algún evento de recombinación entre dichas secuencias, editada y original, introduciéndose el vector completo en el genoma y obteniéndose así la copia funcional del gen de interés.

Sin embargo, el principal problema de la recombinación homóloga de cara a ser utilizado como sistema

de modificación genética es su bajísima eficiencia, siendo efectivo en sólo uno entre cada millón de casos. La eficiencia más alta descrita en mamíferos es de uno en diez mil casos^[4], lo cual sigue siendo inviable como técnica.

Experimentos posteriores lograron aumentar la frecuencia de recombinación, desde 10^{-6} a 10^{-3} , cuando se inducía una rotura de doble hebra en la región del DNA que se pretendiera modificar mediante el uso de una enzima de restricción^[24]. El problema doble de esta técnica es que conlleva la fragmentación del genoma al existir secuencias diana, generalmente de 6 nucleótidos, en múltiples localizaciones del mismo; y que ofrece una menor especificidad para la edición deseada.

El descubrimiento de las meganucleasas, enzimas de restricción descubiertas en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* cuyas secuencias de reconocimiento comprenden unos 20 nucleótidos^[6], permitió obtener frecuencias de recombinación mucho más altas, del orden de 10^{-1} . Si bien la importante limitación de esta técnica es la baja probabilidad de que exista el sitio de reconocimiento de la meganucleasa en la secuencia diana, sirvió de base para el resto de herramientas de edición genética desarrolladas posteriormente.

Así, en 2001 surgieron los primeros prototipos de las nucleasas programables guiadas por dedos de zinc, las Zinc-Finger Nucleases, ZFN^[20], constituidas por una enzima de restricción bacteriana (*FokI*) asociada a dominios de dedos de zinc procedentes de facto-

res de transcripción, los cuales poseen capacidad de unión al DNA. En 2011 se desarrollaron las herramientas de edición génica TALEN^[8], basadas en el mismo principio que ZFN, al fusionar dominios de factores de transcripción de bacterias patógenas de plantas a *FokI*, diseñándose específicamente frente a ambas hebras anexas a la región de corte. Poseían las mismas características que las ZFN, pero con una estructura abierta, pudiendo así diseñarse en laboratorio en una semana de trabajo.

Sistemas CRISPR-Cas

De manera paralela al desarrollo de estas técnicas surgió una nueva herramienta que revolucionaría el mundo de la edición génica: el sistema CRISPR-Cas. Esta herramienta es todo un ejemplo de cómo la investigación básica puede derivar en unas aplicaciones insospechadas. El español Francis Mojica publicó en el año 2000^[21] las pruebas experimentales de la existencia de unas secuencias de DNA repetidas compartidas en genomas de arqueas, bacterias y mitocondrias, que a la postre denominaría secuencias CRISPR. Francis pensó que el hecho de que estas secuencias estuvieran conservadas evolutivamente entre las tres grandes ramas filogenéticas indicaba que su origen era muy ancestral y debían tener, por tanto, una función muy importante. Paralelamente, otro grupo^[14] descubrió la existencia de unos genes adyacentes a las secuencias CRISPR que denominaron genes Cas, que codifican proteínas con actividad endonucleasa.

En el año 2005, tras diez años de trabajo y después de dos años de rechazo en revistas científicas de gran prestigio, Mojica publicó en *Journal of Molecular Evolution* el artículo «Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements», en el que incluyó la propuesta de que este sistema CRISPR-Cas representaría un sistema ancestral de inmunidad adquirida conservado en bacterias y arqueas^[22]. En él se describía que las secuencias repetidas están flanqueadas por unas secuencias espaciadoras que tienen similitud con secuencias de virus bacteriófagos y plásmidos conjugativos. Siempre nos maravillará la absoluta genialidad de Francis Mojica al ser capaz de intuir en la agrupación de las secuencias repetidas la existencia de un mecanismo de defensa a modo de sistema inmune bacteriano.

Grupos de investigación de todo el mundo vislumbraron las posibilidades que implicaban estos descubrimientos y comenzaron a aparecer publicaciones que confirmaban que los elementos CRISPR y las proteínas Cas confieren protección frente a virus en

diferentes bacterias, así como la elucidación del mecanismo molecular y el silenciamiento del sistema CRISPR-Cas en algunos grupos bacterianos. Publicaciones posteriores^[2,19,5,9,13] consiguieron elucidar el funcionamiento del sistema de defensa bacteriano basado en CRISPR. Así, cuando un virus introduce su material génico en la bacteria con el fin de infectarla, si esta infección no es exitosa, se incorporan fragmentos del genoma del virus (espaciadores) entre las secuencias CRISPR por medio de un determinado tipo de proteínas Cas, en un proceso denominado *Adaptación*. De esta forma, la bacteria queda «inmunizada» frente a una nueva infección. Al transcribirse la agrupación CRISPR se produce un RNA precursor (precrRNA), que es procesado dando lugar a moléculas de RNA derivadas de CRISPR (crRNA). Estas últimas se unen individualmente, o junto a una molécula de RNA denominada tracrRNA (según la variante del sistema CRISPR), a una proteína Cas formando complejos efectores (etapa denominada *Expresión*). Frente a un ataque de un virus similar, el complejo efector se une por medio de la secuencia espaciadora a una secuencia complementaria del virus, provocando que la proteína Cas, gracias a su actividad endonucleasa, produzca la rotura del material génico del virus y la consecuente inhibición de la infección, en una etapa denominada *Interferencia*. Este mecanismo en tres etapas, cuya dilucidación ha sido fruto del trabajo de muchos grupos de investigación internacionales, se detalla en la figura 1.

Las secuencias de DNA repetidas han sido utilizadas desde hace tiempo como sistema de tipado bacteriano. El primer firmante de este artículo, prof. Enrique Viguera, estuvo trabajando durante su etapa postdoctoral entre los años 1997-2001 en el *Laboratoire de Génétique Microbienne* (INRA, Francia) y en su nuevo laboratorio en Málaga en el estudio de las bases moleculares de la inestabilidad de las secuencias de DNA repetidas. El bloqueo de la DNA polimerasa durante la replicación de estas secuencias de DNA, capaces de adoptar determinadas estructuras secundarias, causa el cambio en el número de repeticiones por un mecanismo denominado error por deslizamiento de hebra o *replication slippage*^[25]. Las secuencias repetidas del DNA tienen, por tanto, una frecuencia de mutación mucho más alta que las secuencias no repetidas. Este hecho permite usarlas como marcadores para la identificación de cepas bacterianas en estudio con tan sólo determinar el número de unidades repetidas. Esta era la finalidad del grupo del Dr. Gilles Vergnaud (*Institut de Génétique et Microbiologie, Université Paris-Sud*), quien nos visitaba frecuentemente en busca de nuevas cepas para caracterizarlas por la técnica de MLVA (*Multi-Locus*

Variable Number Tandem Repeats Analysis) y con quien teníamos frecuentes seminarios en común.

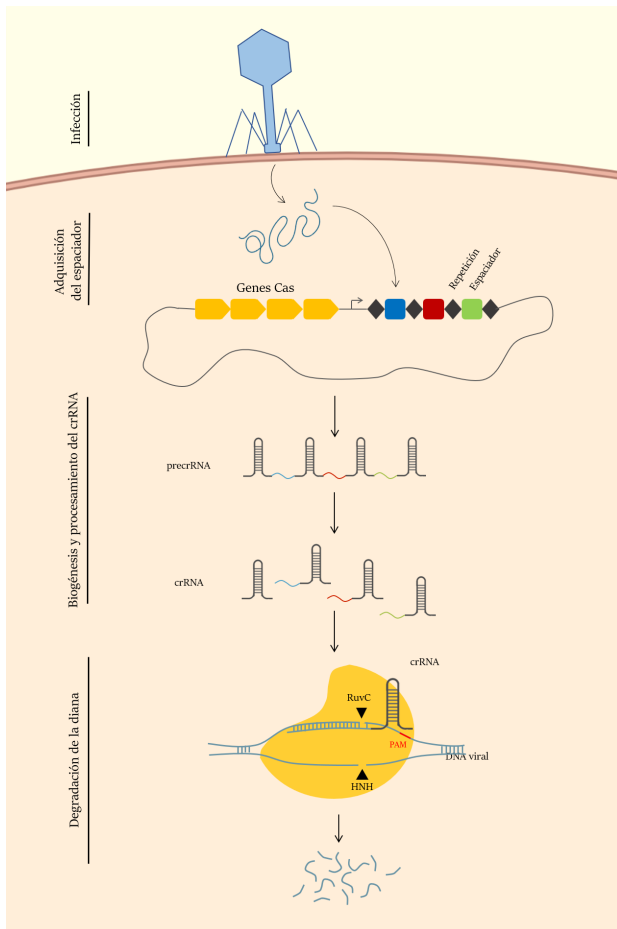


Figura 1. Mecanismo del proceso de inmunización bacteriana tras el ataque de un virus utilizando en Sistema CRISPR-Cas.

Como hemos dicho, Francis Mojica había propuesto en su artículo de 2005 antes citado que, cuando se encuentran en una misma célula una secuencia espaciadora del genoma de la bacteria y la secuencia idéntica en el genoma del virus, el resultado es una infección ineficaz^[22]. La bacteria de alguna forma se «vacuna» tras haber adquirido los espaciadores a partir de virus o plásmidos, impidiendo su propagación. Ese mismo año el grupo del investigador Gilles Vergnaud llegó a una conclusión similar al estudiar los espaciadores aislados en cepas de *Yersinia pestis*^[23] y el grupo de investigación en el que yo trabajaba, dirigido por uno de los investigadores más inteligentes que el primer firmante de este artículo ha conocido, el Dr. S. Dusko Ehrlich, publicaba meses más tarde, gracias a un potente análisis bioinformático, la identificación del origen extracromosómico de las secuencias espaciadoras de los elementos CRISPR^[3].

El primer firmante de este artículo guarda con cariño una libreta de laboratorio en la que, allá por el año 2001, en un seminario de laboratorio entre el

grupo de Ehrlich, Vergnaud y un conferenciante invitado, Gary Benson (*Mount Sinai School of Medicine, NY, EEUU*) describen la existencia de secuencias de DNA repetidas en *E. coli* que estaban flanqueadas por secuencias de «naturaleza desconocida»; al menos desconocidas en aquel momento en el que las bases de datos no tenían la riqueza que tendrían años más tarde. Estas secuencias debían tener una función biológica importante, de lo contrario habrían sido eliminadas durante la evolución por mutaciones del tipo deslizamiento de hebra, anteriormente descritas, pero en aquel momento ninguno de nosotros supo verlo. Sólo dos años más tarde Francis Mojica fue capaz de vislumbrar un mecanismo cuyas aplicaciones biotecnológicas están llamadas a revolucionar la Ciencia. Aun así, pasaron muchos años desde su descubrimiento hasta que fue reconocido en España ¿Habría sido igual si sus resultados hubieran sido aceptados en la revista *Nature*? En ocasiones nos dejamos guiar demasiado por el índice de impacto de una revista y no por la trascendencia del descubrimiento. El 11 de enero de 2016 Francis Mojica impartía la conferencia «Sistemas CRISPR-Cas, una revolución biotecnológica con origen bacteriano» que organizamos en la XIII edición de Encuentros con la Ciencia en Málaga (<https://youtu.be/GOK6FkfmHdQ>), figura 2. Se trataba de la primera conferencia divulgativa que impartía sobre el descubrimiento del sistema CRISPR publicado en 2005... ¡11 años más tarde! La sala de Ámbito Cultural de El Corte Inglés de Málaga, sede de las conferencias, estaba abarrotada de público, nadie se movía de sus asientos. Todos los asistentes sentíamos que estábamos delante de algo grande, figura 3.

Con el paso del tiempo, se han identificado diferentes sistemas CRISPR, que se han agrupado en dos clases^[16]. La Clase I, se encuentra conformada por los tipos I, III y IV, donde existe un elevado número de componentes; mientras que la clase II posee los tipos II (Cas9), V (Cas12) y VI (Cas13), con un número muy inferior de componentes. Es por ello que se hace uso de esta última clase para la construcción de herramientas de edición génica, al permitir una construcción más sencilla.

El salto a las aplicaciones de CRISPR en edición genética vino de la mano de las investigadoras Jennifer Doudna y Emmanuelle Charpentier y por el grupo de Virginijus Siksnys^[15,10] quienes paralelamente demostraron *in vitro* la posibilidad de utilizar el sistema CRISPR para la edición de genes. Un año más tarde, el grupo de Feng Zhang y el de George Church publicaban el éxito de estas técnicas en la modificación génica *in vivo* en células de ratón y humanas^[7,18]. Basta sintetizar una pequeña molécula

la de RNA, denominada RNA guía (sgRNA), que contenga una región complementaria a la secuencia diana que queremos editar (secuencia crRNA) junto a la secuencia tracrRNA, y añadir en el mismo vector la secuencia codificante de la nucleasa Cas9 ligeramente modificada para producir una rotura de doble hebra específica en esta región. Una vez producido el corte de la doble hebra se induce la reparación del daño por parte de la célula, que puede darse por dos vías: mediante unión de extremos no homólogos (NHEJ), o bien vía reparación por recombinación homóloga (HDR). Ambos mecanismos pueden utilizarse para la edición génica. En el primero se induce la inactivación o modificación de un gen concreto, mientras que haciendo uso del segundo podemos insertar en el genoma una secuencia de DNA específica o un cambio determinado (inserción, delección, sustitución, duplicación, etc), al introducir una molécula de DNA con la secuencia deseada que posea en sus extremos complementariedad de secuencia con las regiones que flanquean la zona de corte. Este procedimiento permite modificar cualquier secuencia de DNA de cualquier organismo, ya sea animal o planta, lo que abría unas enormes expectativas en el campo de la terapia génica.



Figura 3. El investigador Francis Mojica impartiendo la conferencia «Sistemas CRISPR-Cas, una revolución biotecnológica con origen bacteriano» en la XIII edición del ciclo Encuentros con la Ciencia.

Variantes de CRISPR

Gracias a la secuenciación de genomas de bacterias y arqueas se han descubierto más de diez sistemas de defensa frente a fagos y plásmidos análogos a CRISPR con, posiblemente, muchas nuevas aplicaciones todavía por descubrir. El sistema más utilizado actualmente corresponde a CRISPR-Cas9 (tipo II, clase II), que realiza corte en doble hebra de DNA gracias a su actividad endonucleasa. Esta actividad es aportada por el dominio catalítico RuvC para una de las hebras, mientras que la otra es cortada por el dominio HNH. Además, para llevar a cabo dicha actividad requiere la ayuda del tracrRNA anteriormente citado. Mediante mutación dirigida puede inactivarse cualquiera de estos dominios de manera independiente, obteniendo un corte de hebra simple. Es la denominada Cas9 nickasa, o Cas9n^[12].

Se han identificado también las proteínas Cpf1 (Cas12a, tipo V, clase II), cuya acción no requiere de la presencia de un tracrRNA; así como Cas13 (tipo VI, clase II), que realiza el corte en RNA y no DNA. Estas proteínas Cas alternativas han posibilitado el desarrollo de técnicas como SHERLOCK, HOLMES o DETECTR orientadas hacia el diagnóstico genético de moléculas de DNA y RNA con una sensibilidad sin precedentes^[17].

Precisamente el sistema SHERLOCK acaba de ser puesto a punto por el laboratorio de Feng Zhang para la detección del coronavirus SARS-CoV2 causante de la enfermedad COVID-19 con una sensibilidad asombrosa, del orden de 10 copias del genoma por microlitro de muestra (Zhang et al, 2020). Este sistema se describe con detalle en este número en el artículo «CRISPR y coronavirus», por el Dr. Lluís Montoliu. Más recientemente se ha desarrollado un nuevo método basado en el sistema SHERLOCK denominado CARMEN (acrónimo de *Combinatorial Arrayed Reactions for Multiplexed Evaluation of Nu-*



Figura 2. Cartel anunciador de la XIII edición de Encuentros con la Ciencia con el motivo de la edición CRISPR como imagen principal.

cleic acids) que permite la detección del coronavirus SARS-CoV2 en más de mil muestras clínicas o la detección simultánea de cientos de especies de virus en muestras clínicas (Ackerman et al. 2020).

Otra de las aplicaciones descritas para la proteína Cas es determinar la posición de una secuencia concreta en el núcleo celular mediante la utilización de una variante de Cas9, dCas9 (*dead Cas9*), inactiva catalíticamente, pero con capacidad de reconocer secuencias específicas al haberle acoplado un reportero como GFP; o mediante la fusión de esta con un efector para regular el control transcripcional de cierto gen o la modulación epigenética de una región. La versatilidad de combinaciones permite un sinnúmero de aplicaciones^[12].

Entre las últimas herramientas que han surgido relacionadas con los sistemas CRISPR encontramos los editores de bases desarrollados por el equipo de David Liu, consistentes en una proteína Cas9n fusionada con un dominio citidín desaminasa o adenosín desaminasa, convirtiendo al sistema CRISPR en una herramienta que puede editar específicamente bases en el DNA, ya que posibilita realizar los cuatro tipos diferentes de transiciones (C→T, G→A, A→G y T→C)^[11].

El mismo equipo de David Liu consiguió dar una nueva vuelta de tuerca con una nueva aplicación: el sistema *Prime Editing* (PE)^[1] que permitía realizar las 12 posibles conversiones de bases (transiciones y transversiones), además de inserciones y deleciones dirigidas por un RNA molde previamente diseñado en lugar de DNA, en un proceso en el que no se produce rotura de doble hebra. Esta aplicación conseguiría, por tanto, corregir la gran mayoría de mutaciones causantes de enfermedades congénitas.

Para ello, los investigadores diseñaron una proteína híbrida que contiene una fusión del dominio de la transcriptasa reversa M-MLC RT a Cas9n, e hicieron uso de un RNA denominado *prime editing guide RNA* (peg-RNA) que posee diferentes regiones específicas: una región con la misma secuencia que la diana que se pretenda editar y que, por lo tanto, permite dirigir al sistema frente a la región del genoma deseada; una región *loop*, que permite el anclaje del peg RNA a Cas9n (scaffold, 72 nucleótidos); una región que sirve como molde para M-MLC RT y que incluye la edición deseada (7-22 nucleótidos); y una región que es idéntica a una sección de la hebra complementaria, que sirve como cebador para la actividad M-MLC RT (región PBS, 5-6 nucleótidos, según contenido GC) y que, por tanto, permite realizar la síntesis de la nueva cadena de DNA. Adicionalmente, se han obtenido variantes más eficientes del sistema *Prime Editing* (PE2 y PE3) y tarde o temprano seguro que

se conseguirá reproducir estos resultados *in vivo*.

En este trabajo los investigadores aseguran que mediante esta metodología *Prime Editing* podrían corregirse hasta un 89 % de los más de 75.000 errores genéticos que causan enfermedades en seres humanos, aquellos producidos por transiciones, transversiones, deleciones, duplicaciones, inserciones u otro tipo de mutaciones. Sin embargo, hay que ser prudentes con estas afirmaciones ya que, de momento, estos experimentos se han realizado en células en cultivo, con diferente eficiencia dependiendo del tipo celular; así como no se ha profundizado en posibles efectos *off-target* en regiones del genoma no estudiadas.

Las posibilidades en los campos de la biotecnología animal y vegetal son enormes, pero aún es prematuro su traslado al paciente, dado que no es factible una técnica que puede reparar un cambio, pero también introducir mutaciones en sitios no deseados. Paralelamente, la rapidez a la que se están produciendo todos estos avances en edición genética han hecho saltar todas las alarmas. De ahí que planteáramos un debate sobre los aspectos éticos en la edición del genoma humano auspiciado por la FEBS y la SEBBM. ¿Qué es curar una enfermedad con base genética y qué es una mejora genética? ¿Debe limitarse el uso de la tecnología CRISPR a funciones terapéuticas? ¿Dónde están los límites? Surgen cuestiones en las que deben participar distintas disciplinas.

Dentro de todo este debate, el equipo del investigador chino He Jiankui comunicó que había usado la tecnología CRISPR para editar embriones humanos. Su objetivo era obtener embriones con una mutación en el gen CCR5 que impidiera al virus VIH utilizar este receptor para entrar en los linfocitos y de esta forma, generar individuos que nunca desarrollaran SIDA. Tras editar los embriones, los implantó y tuvo lugar el nacimiento de tres niñas, dos de ellas gemelas y llamadas Lulu y Nana. Los resultados obtenidos indican que al menos las gemelas son mosaico, es decir, no todas sus células fueron editadas y además contienen mutaciones *off-target* en otras partes del genoma, de consecuencias imprevisibles y que tendrán que ser monitorizadas durante toda su vida. A finales de diciembre de 2019 He Jiankui y dos de sus colaboradores, embriólogos, fueron condenados a penas de cárcel e inhabilitación profesional. Su propósito fue, posiblemente, tener el dudoso honor de ser las primeras personas en editar genéticamente seres humanos, aunque ello implicara saltarse todas las líneas rojas en un experimento que, en palabras del Dr. Lluís Montoliu, es ilegal, imprudente, irresponsable y éticamente inaceptable.

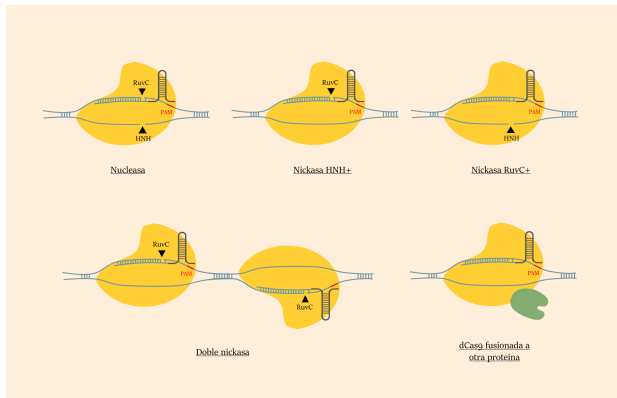


Figura 4. Se muestran diferentes aplicaciones y modificaciones del sistema CRISPR-Cas9. Arriba: pueden inactivarse la actividad endonucleasa de manera independiente para cada dominio, consiguiendo la Nickasa HNH+ o la Nickasa RuvC+. Abajo: puede dirigirse el corte de manera independiente a posiciones distintas en las dos hebras de DNA, lo que permite la formación de extremos cohesivos o bien puede fusionarse a otra proteína. Basado en [12].

Referencias

- [1] Anzalone, A. V., Randolph, P. B., Davis J. R., y otros. Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. *Nature*, 576(7785), 149-157, 2019.
- [2] Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau H., y otros. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*, 315(5819), 1709-1712, 2007.
- [3] Bolotin, A., Quinquis, B., Sorokin, A., y Ehrlich, S. D. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology*, 151(8), 2551-2561, 2005.
- [4] Brinster, R. L., Braun, R. E., Lo, D., y otros. Targeted correction of a major histocompatibility class II E alpha gene by DNA microinjected into mouse eggs. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(18), 7087-7091, 1989.
- [5] Brouns, S. J., Jore, M. M., Lundgren, M. y otros. Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. *Science*, 321(5891), 960-964, 2008.
- [6] Choulika, A., Perrin, A., Dujon, B., y Nicolas, J. F. The yeast I-Sce I meganuclease induces site-directed chromosomal recombination in mammalian cells. *Comptes rendus de l'Académie des sciences. Serie III, Sciences de la vie*, 317(11), 1013-1019, 1994.
- [7] Cong, L., Ran, F. A., Cox, D., y otros. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 339(6121), 819-823, 2013.
- [8] Gaj, T., Gersbach, C. A., y Barbas III, C. F. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends in Biotechnology*, 31(7), 397-405, 2013.
- [9] Garneau, J. E., Dupuis, M. È., Villion, M., y otros. The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature*, 468(7320), 67-71, 2010.
- [10] Gasiunas, G., Barrangou, R., Horvath, P., y Siksnys, V. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(39), E2579-E2586, 2012.
- [11] Gaudelli, N. M., Komor, A. C., Rees, H. A., y otros. Programmable base editing of A · T to G · C in genomic DNA without DNA cleavage. *Nature*, 551(7681), 464-471, 2017.
- [12] Hsu, P. D., Lander, E. S., y Zhang, F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell*, 157(6), 1262-1278, 2014.
- [13] Ishino, Y., Krupovic, M., y Forterre, P. History of CRISPR-Cas from encounter with a mysterious repeated sequence to genome editing technology. *Journal of Bacteriology*, 200(7), e00580-17, 2018.
- [14] Jansen, R., Embden, J. D. V., Gaastra, W., y Schouls, L. M. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Molecular Microbiology*, 43(6), 1565-1575, 2002.
- [15] Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., y otros. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 337(6096), 816-821, 2012.
- [16] Koonin, E. V., y Makarova, K.S. CRISPR-Cas: Evolution of an RNA-based adaptive immunity system in prokaryotes. *RNA Biol.* 10, 679-686, 2013.
- [17] Li, Y., Li, S., Wang, J., y Liu, G. CRISPR/Cas systems towards next-generation biosensing. *Trends in Biotechnology*, 37(7), 730-743, 2019.
- [18] Mali, P., Yang, L., Esvelt, K. M., y otros. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*, 339(6121), 823-826, 2013.
- [19] Marraffini, L. A., y Sontheimer, E. J. CRISPR interference limits horizontal gene transfer in staphylococci by targeting DNA. *Science*, 322(5909), 1843-1845, 2008.
- [20] Miller, J. C., Holmes, M. C., Wang, J. y otros. An improved zinc-finger nuclease architecture for highly specific genome editing. *Nature Biotechnology*, 25(7), 778-785, 2007.
- [21] Mojica, F. J., Díez-Villaseñor, C., Soria, E., y Juez, G. Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria. *Molecular Microbiology*, 36(1), 244-246, 2000.
- [22] Mojica, F. J., García-Martínez, J., y Soria, E. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *Journal of Molecular Evolution*, 60(2), 174-182, 2005.
- [23] Pourcel, C., Salvignol, G., y Vergnaud, G. CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies. *Microbiology*, 151(3), 653-663, 2005.
- [24] Smithies, O., Gregg, R. G., Boggs, S. S., y otros. Insertion of DNA sequences into the human chromosomal β -globin locus by homologous recombination. *Nature*, 317(6034), 230-234, 1985.
- [25] Viguera, E., Canceill, D., y Ehrlich, S. D. Replication slippage involves DNA polymerase pausing and dissociation. *The EMBO Journal*, 20(10), 2587-2595, 2001.