

Trabajo de grado

**La edición genómica como herramienta para la biotecnología
del futuro**

Estudiante

Diego Alonso Baena

CC 15.329.763

CEAD Medellín

Asesora

Dra. Myriam Janeth Ortega Torres

Universidad Nacional Abierta y a Distancia UNAD

Julio de 2018

Tabla de contenido

Tabla de contenido.....	2
Introducción.....	3
Objetivo	7
Historia-antecedentes de CRISPR/Cas	8
Métodos de edición de genomas.....	10
Método de dominios de dedos de Zinc, ZNF.....	11
Método TALEN	12
Método CRISPR/Cas	13
CRISPR/Cas y su implementación como sistema de edición genética en diferentes los diferentes campos de la biología	16
Usos y aplicaciones de los sistemas CRISPR/Cas.....	19
Aplicación en Medicina humana	19
Aplicación en agricultura	20
Aplicación en producción animal	27
Aspectos legales de la edición genética con CRISPR/Cas	29
Bibliografía	¡Error! Marcador no definido.

Resumen

La biotecnología agrícola, en su interés por mejorar métodos y sistemas de producción, ha hecho uso de diversas ramas de las ciencias biológicas para intervenir organismos, con el fin de aumentar su productividad y resistencia a diversos factores medioambientales. El presente trabajo ofrece una revisión monográfica de la edición genómica como herramienta biotecnológica utilizada para la manipulación genética en los diferentes campos de la biología y la medicina, donde el método CRISPR/Cas9 se ha posicionado como el que mayores posibilidades ofrece para la edición de genes en las diversas especies biológicas con el fin de obtener un producto específico. Tal es el caso de la edición de los genes SIGAD en el tomate, *Solanum lycopersicum*, con lo cual se ha logrado conseguir una mayor concentración de ácido aminobutírico en la fruta.

Abstrac

Agricultural biotechnology, in its interest to improve methods and systems of production, has made use of diverse branches of the biological sciences to intervene organisms, in order to increase their productivity and resistance to various environmental factors. The present work offers a monographic review of the genomic edition as a biotechnological tool used for genetic manipulation in the different fields of biology and medicine, where the CRISPR / Cas9 method has been positioned as the one that offers the greatest possibilities for the edition of genes in the various biological species in order to obtain a specific product. Such is the case of the edition of SIGAD genes in tomato, *Solanum*

lycopersicum, with which, a higher concentration of aminobutyric acid in the fruit has been achieved.

Palabras clave: biotecnología, edición genómica, CRISPR/Cas, DNA, RNA, proteínas.

Introducción

Uno de los descubrimientos más importantes durante la última década en el campo de la biología molecular fue el encontrar que las bacterias tienen sistema inmunológico propio, el cual usa para defenderse del ataque de virus y plásmidos. Este sistema, denominado CRISPR/Cas (*cluster regularly interspace sequence palindrome repeats o racimos de secuencias palíndromes repetidas espaciadas*), se basa en un complejo enzimático y ARN, con el cual, al ser atacada por un invasor, realiza una especie de escaneo genómico, identifica segmentos genético específicos del ADN extraño y lo incorpora a su propio genoma, con lo que arma su propio mecanismo de defensa biológico, semejante al mecanismo de defensa adaptativo, de los organismos superiores.

Una vez que la bacteria tiene la fotografía del material genético del invasor, en el momento en que éste decide atacar nuevamente, la memoria genética bacteriana activa las señales que pondrán en función el sistema CRISPR/Cas, destruirán el ADN del virus o plásmido impidiendo su replicación e infección.

Los científicos empezaron a dominar el sistema CRISPR/Cas en diferentes especies, tanto humanos, animales y plantas, ya que la herramienta, por su sencillez en la manipulación, ha mostrado ser uno de los descubrimientos más promisorios de la biología molecular y la ingeniería genética, buscando así, la cura para muchas enfermedades, la obtención de mejores y más económicos medicamentos, animales más productivos y resistentes, al igual que de plantas de interés económico mejoradas.

En esta revisión se hará un recorrido histórico por los momentos de mayor importancia correlacionados con los principales hitos que permitieron el descubrimiento

del sistema por el español Francisco Mojica, desarrollo de las tecnologías CRISPR/Cas y el reconocimiento del gran panorama de aplicación en todos los sistemas biológicos propuestos por Jennifer Doudna y Emmanuelle Charpentier, de igual manera se plantearán las preguntas éticas y legales respecto a la posibilidad de aplicación de este mecanismo de edición biológica.

Objetivo

1. Revisar los antecedentes históricos de los principales acontecimientos que dieron origen a los métodos de edición de los genomas.
2. Realizar una revisión de literatura sobre la metodología de edición de genomas animales y vegetales, haciendo énfasis en CRISPR/Cas.
3. Comparar a nivel molecular, los diferentes métodos de edición de genomas actuales.
4. Determinar la utilidad biotecnológica del método CRISPR/Cas, enfocado a resolver un problema de producción vegetal.
5. Determinar las principales implicaciones éticas de los métodos de edición del genoma.

Historia-antecedentes de CRISPR/Cas

Luego de que los científicos Watson y Crick publicaran su descubrimiento de la doble hélice de ADN, en 1953, comienza una carrera biogenética sin precedentes en la historia de la humanidad (Kotsias, 2003). El conocimiento de esa estructura molecular, determina las bases para el nacimiento de la biología molecular tal y como se conoce hoy (Bolívar, 2007). Hallazgos como las rutas de la biosíntesis de los aminoácidos, el ADN recombinante y la transferencia de información genética, permite que la biología molecular cobre amplia relevancia en el ámbito científico (Westerhoff & Palsson, 2004).

Aunque este hecho fuera de gran importancia dentro de la ciencia moderna, el gran avance de la biotecnología actual y del futuro está determinado por el descubrimiento de CRISPR/Cas (López, 2015). Más, para llegar a tal punto tuvo que pasar mucho tiempo y diversos hallazgos científicos. Para el año 1952, Luria y Human, Anderson y Félix, publican lo que llamaron el “*control controlado del anfitrión de virus bacterianos*” (Loenen, Dryden, Raleigh, Wilson, & Murray, 2013). Dicho estudio describe que la capacidad de infección del fago depende del hospedero bacteriano, ya que cepas de bacterias infectadas previamente, no se podían infectar de nuevo con el mismo invasor viral (Luria, 1953).

Luego, en el año 1962, Werner Arber, aísla (Corvolán, 2002) y demuestra bioquímicamente la función de las enzimas de restricción (Roberts, 2005), encontrándose tales enzimas en las bacterias, como parte de un sistema de defensa dirigido a un ADN invasor, que este cortado en sitios específicos, pero que gracias a la metilación, con la cual la bacteria marca su propio ADN, no corta su ADN (Mathews, Van Holde, & Ahern, 2002)

En la década de los años 70, H Smith, purifica las primeras enzimas de restricción (Aldecoa & Battilana, 2006). En 1987, el japonés, Yoshizumi Ishino, descubre las secuencias palindrómicas repetitivas, base para entender el sistema CRISPR (Giddings, 2017), pero es, a finales de los años 80, el científico Francisco Mojica, mientras realiza su tesis doctoral y buscando los mecanismos biológicos de cómo los microorganismos de las salinas de Santa Pola, los *Haloflex mediterranei*, pueden adaptarse a las altas concentraciones de sal, quien descubre las regiones del genoma que, para su tiempo, sólo creó curiosidad y mayores interrogantes al respecto (Martínez, 2016).

Luego, en el año 1993, describe y asienta el nombre de CRISPR, *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*, por sus siglas en inglés, mientras que para el año 2003, se revela que tal sistema repetitivo del genoma bacteriano genera un sistema de defensa contra los ataques virales (Mojica F. , 2016). Tal sistema de defensa bacteriano funciona como en banco de memoria, en el cual la bacteria toma fragmentos del ADN viral y lo introduce a su propio genoma, para posteriormente utilizarlo para identificar futuros ataques de ese mismo virus (Vetcher, 2017).

A más de una década de estudios, en el año 2012, aparecen en escena Jennifer Doudna y Emmanuelle Charpentier, quienes descubren la verdadera funcionalidad del sistema CRISPR/Cas (Corbyn, Biology's big hit, 2015), para convertirlo de un sistema de defensa bacteriano, en una herramienta de edición genética que pueda utilizarse en el campo de la salud humana para el control y prevención de enfermedades, mejoramiento animal y vegetal. Demostrando la facilidad con que CRISPR/Cas puede modificar el ADN de un organismo, de manera eficiente, económica y rápida comparada con otros métodos de edición genómica (Gilbert, y otros, 2013).

Métodos de edición de genomas

La edición genómica busca la modificación de segmentos específicos de ADN dentro del genoma de diversas especies, con el objetivo de corregir mutaciones, crear nuevas o impedir la expresión de genes que no representen interés biológico o comercial.

La edición genómica, basada en el sistema CRISPR/Cas, compuesto por las secuencias CRISPR, una endonucleasa CAS y un ARN denominado guía (Alviso, 2017), identifica sitios específicos dentro del ADN blanco, corta la doble hélice y permite que el sistema de reparación celular, inserte o corrija secuencias dentro un gen de interés (Zischewsky, Fischer, & Bortesi, 2017). Aunque se han identificado diversos sistemas CRISPR/Cas, para la edición de genomas, es el sistema tipo II, de los tres tipos identificados a la fecha, el que presenta mayor sencillez y simplicidad, ya que cuenta con una sola endonucleasa, la Cas9, la cual es guiada por el ARN guía hacia la secuencia blanco, y allí la endonucleasa corta y los sistemas de reparación celular actúan (Kennedy & Cullen, 2015).

Es hacia el año 2012 cuando Emmanuel Charpentier y Jennifer Doudna, investigadoras de la Universidad de Berkley y del Instituto Max Plank, logran realizar un primer corte de ADN utilizando el sistema CRISPR/Cas9 y publican (Jinek, y otros, 2012) los posibles logros a los que se llegaría controlando adecuadamente tal sistema defensivo bacteriano, tanto en medicina humana, mejoramiento animal y vegetal (Becú-Villalobos, 2017).

El promisorio sistema de edición genética, que se puede resumir como cortar y pegar, cual, si fuesen unas tijeras especiales para disección molecular, permite la

corrección de secuencias de ADN en genes específicos (Lal, y otros, 2017), logrando la inserción o delección (INDELS) de nucleótidos en los sitios blanco, con lo que se lograría la represión o inactivación de la expresión genética en un organismo (Lammoglia-Cobo, y otros, 2016).

El descubrimiento de CRISPR/Cas aporta innovación y avance en el campo de la medicina humana, ya que enfermedades hasta ahora incurables, de origen genético, podrían ser tratadas con la reparación de las secuencias defectuosas del gen responsable (Giono, 2017). En este contexto, ya se han adelantado ensayos clínicos para algunos tipos de cáncer (Zhen, y otros, 2014), como terapia antimicrobiana debido a la resistencia que las bacterias han adquirido frente a los antibióticos (Chávez-Jacobo, 2018).

En el pasado ya han sido diseñados diferentes sistemas de edición del genoma basados en la utilización de endonucleasas, de los cuales las nucleasas de dedos de Zinc y TALEN han sido los más empleados (Xiao, y otros, 2013). Tales sistemas han sido relevantes por su alta precisión para identificar secuencias en el sitio de corte del ADN y la facilidad para causar inserciones o delecciones (Indels) dentro de sitios de genes específicos (Centeno, Coma, Rodríguez, & Zea, 2015), pero es el sistema CRISPR/Cas el que se ha convertido en el centro de atención debido a su sencillez en manejo y rápidos resultados (Crispo, y otros, 2015).

Método de dominios de dedos de Zinc, ZNF

Los métodos desarrollados para la edición de genomas comienzan con el uso de las meganucleasas, nombre debido a que ellas pueden reconocer regiones entre 12 y 40 nucleótidos, dentro de la secuencia de ADN (Vargas Hernández, Hinojosa Juárez, &

Mendieta Zerón, 2017). El método conocido como dominios de dedos de Zinc, ZNF, se basa en la identificación de secuencias específicas de ADN, y por medio de nucleasas, con el cual puede hacerse cortes precisos a la doble cadena de ADN (Riesgo, 2016), que luego es reparada, de forma imperfecta, por medio del proceso de reparación del ADN no homóloga (Hansen, y otros, 2012). Pero, aunque este método ha sido un gran avance en la mejora génica, ha mostrado deficiencias como la poca especificidad en los cortes del ADN, su alto costo de implementación y el largo tiempo requerido para la obtención de resultados (Díaz, Zárate, & Bernal, 2016).

Método TALEN

El método TALEN (*Transcription Activator like Effector Nucleases*), por sus siglas en inglés, utiliza proteínas con dominios de endonucleasas y de unión al ADN, originado de los efectores TAL de *Xantomonas* (Casacuberta & Puigdomènech, s. f.) adheridos a dominios FokI no específicos. Las estructuras formadas por la repetición de los 34 aminoácidos en la enzima, el cual cada uno contiene un residuo doble de repetición variable, es la clave para identificar hasta un solo nucleótido diana (Liang, Zhang, Chen, & Gao, 2014). Los factores de transcripción y nucleasas de TALEN, han demostrado gran efectividad en la regulación dirigida y la modificación de genes endógenos (Miller, y otros, 2011). Pero su limitación se centra en crear una proteína específica para cada corte o sitio diana en el ADN, lo cual requiere de mayor tiempo para su aplicación y obtención de resultados (Jinek, y otros, 2013).

Método CRISPR/Cas

El método CRISPR/Cas (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*), hace referencia a una sucesión de secuencias palindrómicas cortas, separadas por secuencias espaciadoras que actúan como un banco de memoria genética de invasores exógenos (López, 2015). Es un sistema biológico que cumple las veces de sistema de defensa antiviral, adaptativo, el cual fue descubierto en el genoma de bacterias y arqueas (Reyes, Olivera, & Guerra, 2016). Tal sistema de defensa o inmunológico actúa conservando en su propio material genético, fragmentos de ADN extraños, tomados de cada uno de los invasores, virus o plásmidos, que atacan la bacteria, el cual es heredable a su descendencia (Barrangou & Marraffini, 2014).

Es el método de mayor éxito para la edición de genomas, ya que se obtienen resultados positivos en poco tiempo, es de fácil acceso y es poco costosa su implementación (Pettinari, 2016). Este sistema actúa bajo un complejo proteínico determinado, donde Cas es una endonucleasa asociada a tal complejo, y la encargada de hacer los cortes en la doble cadena de ADN diana, guiada por un crARN, donde luego se pegarán y se almacenarán los fragmentos de ADN extraño (Van Der Oost, Westra, Jackson, & Wiedenheft, 2014), y CRISP corresponde a las secuencias cortas y espaciadas en las cuales se ha integrado tal material genético foráneo que fueron pegados luego de los cortes de la endonucleasa Cas que actuarán como memoria genética (Li, y otros, 2013).

La estructura del sistema CRISPR se encuentra formada por un promotor que funciona como regulador de las transcripciones del sistema, diversas secuencias espaciadoras, que oscilan entre 25 a 50 pares de bases(pb), acompañado de elementos repetitivos que son los que suelen formar los palíndromos, que pueden ser de hasta 32

nucleótidos (Wright, Núñez, & Doudna, 2016). Pero para que CRISPR confiera la inmunidad adaptativa en las bacterias y arqueas, requiere de tres etapas fundamentales: Primero, etapa de adquisición, en la cual se identifican los nuevos espaciadores que se integrarán al sistema. Segundo, etapa de expresión, en la cual se procesan transcritos de ARN CRISPR pequeños, crARN, a partir de la matriz CRISPR transcrita y tercero, etapa de interferencia, donde Cas, dirigida por el crARN, hace el corte de la doble cadena de ADN, de fragmentos homólogos del fago invasivo, para integrarlo a locus CRISPR del hospedero (Hsu, Lander, & Zhang, 2014).

Los sistemas CRISPR/Cas, se clasifican en tres grandes grupos: sistema CRISPR/Cas I, CRISPR/Cas II y CRISPR/Cas III (Ran, y otros, 2013). Esta clasificación se ha fundamentado en la diversidad existente en las secuencias repetidas de los CRISPR, en las secuencias de los genes cas y en la estructura misma del operón Cas (Medina, y otros, 2011), y donde cada tipo de sistema contiene endonucleasa en particular que lo hace único: el sistema CRISPR/Cas tipo I se integra con la nucleasa Cas3-helicasa, los sistemas CRISPR/Cas tipo II, se determinan por la nucleasa Cas9, mientras que los sistemas CRISPR/Cas tipo III, poseen la enigmática nucleasa Cas10 (Nishitsu & Nureki, 2017). Por lo tanto, las proteínas Cas se agrupan en 4 grupos, de acuerdo a su operatividad en el sistema CRISPR:

- 1- Recombinasas, las cuales participan en la identificación y consecución de los espaciadores.
- 2- Ribonucleasas, favorecen el desarrollo de guías de crARN.
- 3- Proteínas vigilantes, que unidas a ARN guía crean el complejo crARN para vigilar el ADN diana.

4- Nucleasas, se encargan de la degradación del ADN o ARN del fago invasor (Raht , Amlinger, Raht, & Lundgren, 2015).

El sistema CRISPR/Cas II, el cual posee la endonucleasa Cas9, con el que forma el complejo CRISPR/Cas9, es el sistema que genera la resistencia inducida en procariontes y arqueas, y el de mayor eficiencia para la edición de genes en diferentes especies (Romay & Bragard, 2017). Cas9 posee dos dominios que son los que directamente responsables del corte, programado por el crRNA, de la doble cadena (DSB) de ADN diana: dominio conservado helicasa (HNH) y el dominio nucleasa (RuvC) (Port, Chen, Lee, & Bullock, 2014). Luego que el sitio diana, u objetivo ADN, identificado para el corte, el crRNA y Cas, identifican una secuencia corta de ADN inmediatamente posterior del sitio previamente reconocido, y es ahí donde se realiza el corte de inserción y delección, con lo cual se crea la inmunidad de los microorganismos, este sitio se denomina Motivo Adyacente Protoespaciador o PAM (Schiml & Puchta, 2016).

La relevancia del sistema CRISPR/Cas se consigue en el momento en que la hibridación de crRNA y la proteína Cas logra madurar. La bacteria al identificar el genoma del invasor viral, toma secuencias cortas para integrarlas en su propia matriz CRISPR (Wright & Doudna, 2016). El proceso comienza con un ARN guía, que consta de crARN y un ARN transactivador, tracrARN, el cual posee complementariedad a un locus CRISPR, que luego se une a la proteína Cas (Komor , Badran, & Liu, 2017). Ya unidos, el binomio tracrARN/Cas, su función consiste en identificar secuencias precursoras de crARN. Luego, la enzima ARNasa III, cataliza el ARN de doble cadena, dsARN, y se produce, entonces, el complejo tracrARN-crARN-Cas como el sistema defensivo de la bacteria (Doudna & Charpentier , 2014). Cuando la bacteria es reinfectada por el fago, tal

complejo sale en busca de secuencias homólogas, y una vez entra en contacto con ellas, la proteína Cas reprogramada, procede a la degradación del ADN viral invasor. (Horvath & Barrangou, 2010).

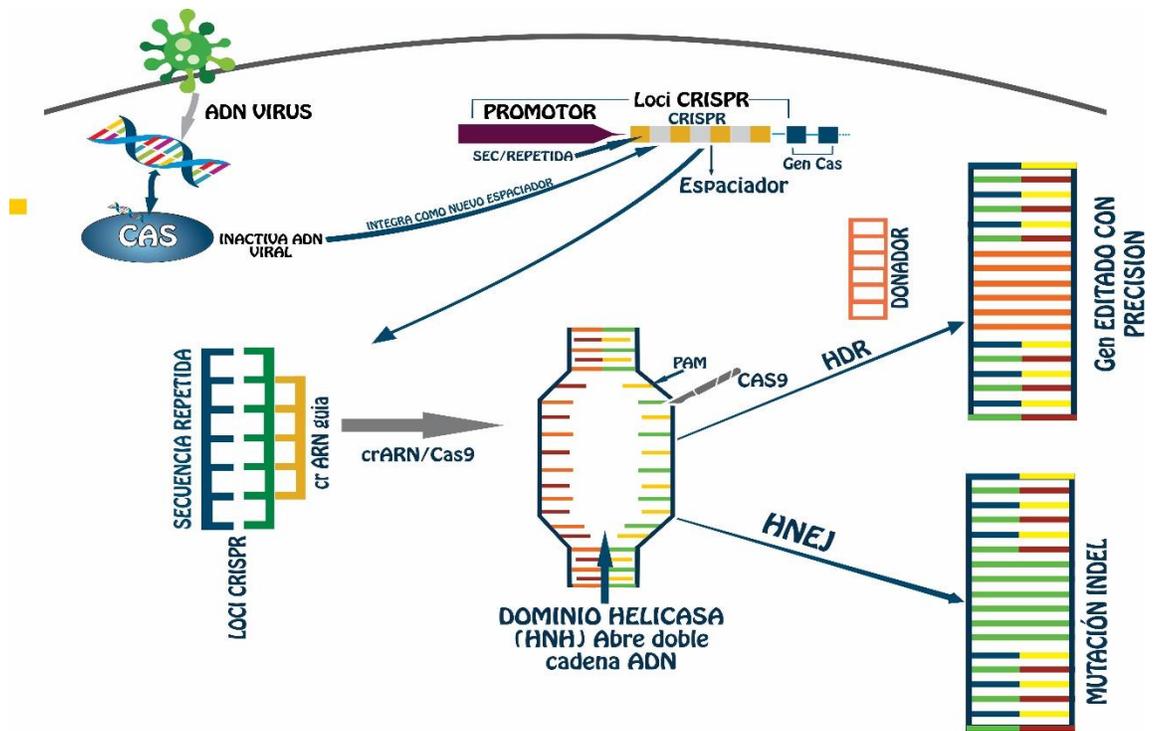
CRISPR/Cas y su implementación como sistema de edición genética los diferentes campos de la biología

El sistema de inmunidad bacteriana, CRISPR/Cas, se vislumbra como una herramienta de gran eficacia para el moldeamiento de los genes de todas las especies, con el fin de aprovechar todo el potencial genético que cada una puede ofrecer para mejorar la vida del ser humano. Sin embargo, aunque no se conoce su verdadero alcance, ni sus posibles implicaciones adversas de su uso, hasta el momento se ha podido estandarizar la técnica CRISPR/Cas9, que, en algunos procesos de mejoramiento genético, tanto en animales, como en plantas, y algunos procesos médicos en humanos, se puede inferir el gran futuro que podría llegar a tener como medio de reparación y potenciador genético.

Por tanto, luego de estudiar los procesos de inmunización e inmunidad del sistema CRISPR/Cas, adquirido por las bacterias, las investigadoras J. Doudna y Charpentier, descubrieron que simplificando este proceso, en el cual se obvia la mediación del pre-crARN y su maduración, y por ende la actividad o intervención de la RNasa III (Qi, y otros, 2013), y que fusionando el tracrARN con crARN, se consigue un sgARN, capaz de guiar a Cas9 al sitio del blanco del ADN que se quiere editar (Jiang, y otros, 2013), a la vez que este sgARN se puede programar con las secuencias de nucleótidos deseados para hacer el corte de ADN y la modificación genómica que se quiere (Tycko, Meir, & Hsu, 2016). Pero, aunque se haya simplificado el proceso, el motivo PAM sigue su función

como indicador de corte de Cas9 en el ADN diana (Osakabe, y otros, 2016) y la complementariedad en la unión de bases gARN y ADN objetivo (Oh, Choi, & Lee, 2018).

Ahora bien, como el ADN, luego de una rotura, o corte, inicia su proceso de reparación, como se observa en la gráfica No.1, con el fin de preservar la integridad estructural del genoma, puede tomar una de las dos rutas de reparación, dando lugar a la integración de las nuevas secuencias en su estructura, o eliminando las no deseadas (Méndez & Garro, 2018). Entonces se tiene Recombinación no homóloga (NHEJ), como vía de reparación del ADN, en la cual no es necesaria una homología en los extremos de unión en los que comienza la reparación (Hryhorowicz, Lipinski, Zeyland, & Slomsky, 2017). Aunque esta ruta de reparación está presente en todos los organismos eucariotas, si los extremos de las ligaduras, y la reparación es incorrecta, puede llegar a la delección de secuencias indeseadas, a la inactivación del gen objetivo, inclusive a la activación de genes *off target*, (que no se encuentran en el diseño de la edición, y son modificados de forma involuntaria durante el proceso) (Gilbert, y otros, 2014). Por tanto, la vía de reparación homóloga dirigida (HDR), reconoce secuencias idénticas en el ADN, sin alterar las secuencias en los moldes diseñados para los objetivos de corte y reparación, mejorando, de esa forma, la precisión en la edición de los genomas (Morales, 2018).



Gráfica 1: Estructura funcional CRISPR/Cas9

Usos y aplicaciones de los sistemas CRISPR/Cas

Las aplicaciones de los sistemas CRISPR/Cas en la biología molecular y la ingeniería genética, abre un sinnúmero de posibilidades para la cura de enfermedades en humanos, ya sean de origen genético o no (Ayala, 2017); en la búsqueda de mejoras de interés comercial en animales, como es la producción de carne, leche, lana etc. Mientras que en plantas las aplicaciones no son menos importantes ya que puede encontrarse la posibilidad de mejorar cultivos que resistan los diferentes tipos de estrés a los que son sometidos en el medio en que se desarrollan, de aumentar producción por unidad de área, encontrar resistencia a plagas y enfermedades que ya son incontrolables en algunas especies y lugares.

Aplicación en Medicina humana

Dentro de los aspectos de mayor relevancia, CRISPR/Cas, para la medicina humana, es el de la búsqueda del origen genómico de las enfermedades como el cáncer, el desorden neurodegenerativo y patologías fisiológicas (Van Giau, Lee, Shim, Bagyinszky, & An, 2018). El aspecto multigenético y de mitosis descontrola del cáncer, el cual se presenta por la alteración del ciclo celular, es un objetivo que pueda enfocarse la tecnología CRISPR/Cas (Callejas, y otros, 2018). La terapia genética desarrollada en medicina humana con CRISPR/Cas, se está centrando, entonces, en la corrección de trastornos genéticos neurológicos, producción de antivirales, corrección de mutaciones cancerígenas y como antibiótico (Khan, y otros, 2018).

Aplicación en agricultura

Los sistemas CRISPR/Cas han sobrepasado las técnicas anteriores de edición de genomas, ya que se presenta una gran versatilidad, economía, rápidos resultados y menos efectos fuera de objetivo (Wolter & Puchta, 2017). Estas bondades de la nueva técnica de la ingeniería genética brindan un futuro prometedor para la agricultura mundial, ya que pueden modificarse características del genoma de las plantas, de forma muy precisa y de gran utilidad en términos productivos (Arora & Narula, 2017).

La obtención de plantas resistentes a factores bióticos y abióticos, así como el aumento de la producción de comida para los 9700 millones de personas que se prevé habrá en el mundo para el año 2050, son algunos de los retos que se pretende enfrentar con la tecnología CRISPR/Cas (Ainsworth, 2015). Dado que, en la técnica, por tener una intervención directa en el genoma, las plantas que son manipuladas, pueden evaluarse con mucha rapidez, lo que conlleva, por ende, un acelerado crecimiento de los cultivos para las condiciones deseadas (Cao, Wang, Le, & Vu, 2016)

La eficiencia de los sistemas CRISPR/Cas como herramienta de edición, no sólo permite crear modelos editados, sino cultivos de interés comercial y alimenticio, como también sus beneficios en entornos ecológicos para la conservación de ecosistemas (Noman , Aqeel, & He, 2016).

La investigación agrícola de modificaciones genéticas en plantas, muestra un número creciente, tanto de plantas, como de rasgos fenotípicos en ellas, que no era posible realizar antes del descubrimiento de CRISPR/Cas, debido a lo costoso que resultaba y al tiempo que se debía emplear (Butler, Atkins, Voytas, & Douches, 2015). Cultivos como el maíz; el cual siempre ha sido objeto de investigación en la ingeniería genética de

plantas, el trigo, la papa, el tomate, plantas ornamentales, entre otros, son objeto de modificaciones con resultados exitosos (Zúñiga Orozco, 2017).

Los genetistas, o mejoradores, de plantas, han tratado problemas que se generan en plantas de mucho interés comercial para tratarlos con la tecnología CRISPR/Cas, como es el caso del champiñón, de consumo humano, *Agaricus bisporus*, (Gross, 2016), para evitar su oxidación, bloqueando la acción de la enzima polifenol oxidasa (Waltz, 2016), la cual se activa en presencia de oxígeno y hacerlo más atractivo al comercio; la edición genética en plantas de algodón, usando un vector con sitios múltiples de edición, para conseguir mayor rendimiento en la producción (Wang, y otros, 2018), así como inducción de resistencia a herbicidas en el cultivo de arroz y mutagénesis dirigida en puntos específicos en cultivos de tomate, entre otros (Shimatani, 2017).

Pero uno de los avances en el uso de la tecnología CRISPR/Cas en la agricultura, que contribuye a la salud humana, se observa en el cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum*), el cual es utilizado para aumentar el contenido del ácido γ -aminobutírico (GABA) en el fruto. Este aminoácido no proteico (intermediario metabólico con estructura de aminoácido, pero que no aparece en las proteínas (Salamanca, s.f.)) ha sido el foco de muchos estudios con respecto a los beneficios sobre la salud humana, ya que puede ser utilizado como antihipertensivo o antidepresivos (Santos, y otros, 2018), interviniendo en la excitación neuronal y como regulador de la consistencia muscular en mamíferos (Watanabe, Maemura, Kambara, Tamayama, & Hayasaki, 2002).

El ácido gamma-aminobutírico, o GABA, es considerado el principal neurotransmisor de efecto inhibitorio en el sistema nervioso central en mamíferos (Rengifo & Torres-Fernández, 2007). Y, aunque esta sustancia se descubrió en plantas,

sin que su papel en ellas haya sido claro por ese entonces, fue la identificación en grandes cantidades en el cerebro humano; y otras especies, por lo que las investigaciones para determinar las funciones de este neurotransmisor se han disparado de forma exponencial (Anju, Moothedath, & Shree, 2014).

El metabolismo de GABA se ha planteado por una ruta metabólica corta denominada *shunt* GABA (Bao, y otros, 2015). Esta ruta se salta dos pasos del ciclo tricarboxílico convencional (Martin & Rinvall, 1993), para lo cual intervienen las enzimas α -glutamato descarboxilasa (GAD), GABA-oxoglutarato transaminasa y la semialdehído deshidrogenasa succínica.

Por lo tanto, las plantas, aunque en condiciones normales presentan unas concentraciones bajas de GABA, al ser sometidas a condiciones de estrés, ya sea biótico o abiótico, genera acumulación de grandes cantidades de esta sustancia en diferentes partes de ella (Kinnersley & Turano, 2000). Cultivos como el tomate, *Solanum lycopersicum*, contiene concentraciones relativamente altas en condiciones normales, cuando la fruta se somete a condiciones de hipoxia, estas concentraciones pueden subir entre un 60 a 90% (Mae, y otros, 2012), lo que corrobora su alta presencia en factores de alto estrés.

El tomate se considera una de las hortalizas de mayor consumo en todo el mundo, lo cual se encuentra asociado a sus propiedades nutricionales (Palomo, Moore-Carrasco, Carrasco, Villalobos, & Guzmán, 2010). Sus contenidos de ácido gamma aminobutírico, y sus beneficios para la salud humana (Saito, y otros, 2008), lo han convertido en un objetivo clave de la ingeniería genética para mejorar su concentración y poder entregar al consumidor una fruta natural y con mayor contenido de GABA.

En el marco de las investigaciones sobre el aumento del ácido gamma aminobutírico en las plantas, se han desarrollado diferentes ediciones genéticas utilizando el sistema CRISPR/Cas9, interfiriendo algunos genes en su ruta metabólica (Li, y otros, 2018). En las plantas de tomate, *Solanum lycopersicum*, se han identificado cinco genes GAD (SIGAD1-5), que interfieren en la producción de GABA, tanto en hojas como en frutos.

Un grupo de investigadores de la Universidad de Tsukuba, Japón, realizó una edición genética utilizando los sistemas CRISPR/Cas9 para eliminar el dominio C-terminal, que actúa como proteína autoinhibitoria de los genes GAD, específicamente de los genes SIGAD2 y SIGAD3 que son los que se expresan en el momento de maduración de la fruta de tomate, y evita la concentración de GABA en los tejidos de la planta.

Para determinar la secuencia diana donde se realiza el corte de la doble cadena de ADN del mapa genómico de las especies de plantas a editar, se compararon 10 secuencias de aminoácidos de cinco especies de plantas diferentes. Para el gen SIGAD2 se toman los 30 y 48 aminoácidos en el extremo C, mientras que para SIGAD3 se usaron 37 aminoácidos como objetivo CRISPR/Cas (Nonaka, Arai, Takayama, Matsukura, & Ezura, 2017). Para evaluar la actividad de los genes SIGAD2 Δ C30, SIGAD2 Δ C48 y SIGAD3 Δ C37, se usó un sistema de expresión de *E. coli* a pH 5,8 para actividad GAD y a 7,0 para células vegetales.

En las pruebas realizadas para actividad GAD a pH 5,8 los resultados de SIGAD2 Δ C30, SIGAD2 Δ C48 y SIGAD3 Δ C37, la concentración de GABA fue de 2.2, 2.7 y 14.6 mayor para cada uno; mientras que la prueba de células vegetales a pH de 7,0 las concentraciones obtenidas de GABA fueron 10.2, 16.5, y 12.9 mucho mayor respectivamente.

Los resultados ya mencionados del silenciamiento genético con CRISPR/Cas de C-terminal muestran que se optimiza la actividad enzimática de los SIGAD, dando como resultado final el aumento de GABA en los frutos de tomate a los pH determinados, y prescindiendo de Ca²⁺/CaM (Calmodulina-CaM), que actúa como un potenciador de la actividad GAD.

De las plantas editadas con CRISPR/Cas9, se secuenciaron 31 líneas correspondientes a la cantidad mutadas. Luego de haber insertado los arreglos, o vectores, CRISPR/Cas9, TG2C30, TG2C48 y TG3C37, por medio de *Agrobacterium*, se detecta la mutación en el sitio objetivo, mediante la clonación del vector pGEM-T (Promega, Madison, WI, EE. UU), y de los 257 clones creados, se comprueba la edición a través de secuenciación por el método convencional de Sanger. De los clones se secuenciaron 31 líneas; las cuales presentaron diferentes mutaciones, y sólo una careció de cambio en su secuencia genética.

Además, se determinó la cantidad de aminoácidos correspondiente a las secuencias de ADN para la verificación del codón stop en el dominio autoinhibidor del C-terminal. Las líneas mutantes se clasificaron en cuatro tipos (I, II, III y IV) de acuerdo a sí se producían cambios en la secuencia de aminoácidos de la C-terminal y a la cantidad de mutaciones que se produjeron. El tipo I, TG3C37, que representa el 12,9%, presentó un codón stop inmediatamente contiguo al dominio autoinhibidor y no se observó el C-terminal. El tipo II, TG2C30, equivalente al 29%, indicó dos tipos de mutaciones, donde se observó un dominio C-terminal conservado, al igual que uno defectuoso, pero el tamaño de C fue parecido al de la especie silvestre. El tipo III, TG2C48, fue el más abundante con

el 48,3%, poseía mutantes de tipo I y tipo II. El tipo IV, con un 9,8%, fue supremamente corto e igual a los silvestres.

Las líneas mutantes presentan diferentes concentraciones de GABA en el fruto maduro y rojo de tomate. La línea TG2C30, en 3 de sus 8 mutantes presentó entre 2 y 10 veces mayor concentración de GABA que la especie silvestre. La línea TG2C48, en 5 de 8 mutantes, presentó entre 1,5 y 3,6 veces mayor concentración. La línea TG3C37 indicó que, en 7 de sus 9 mutantes, se encontraban niveles, también mayores los cuales no se reportaron, mientras que el resto de las líneas se encontraron niveles similares a las especies silvestres.

El estudio muestra una relación directa entre el silenciamiento de C-terminal y la acumulación de altas concentraciones de GABA en los mutantes de tipo I, TG3C37 y tipo III, TG2C48. Mientras que en los de tipo II y IV mostraron niveles iguales a los silvestres, contrastando con el tipo de mutación generada.

Se evaluaron otros factores como el desarrollo de la planta, el tiempo de floración y número de flores, como también cantidad de frutas y tamaño de la misma. El desarrollo de las plantas presenta menor tamaño que las líneas silvestres, pero sin rasgos fenotípicos diferentes. Mientras que algunos ejemplares mutantes, especialmente 2 de TG2C48, hubo retraso de la floración, en algunos de TG2C30 fue completamente nula, mientras que en el resto de las líneas no se presentó variación alguna. Contrastando con la floración y su desarrollo en esa etapa fenológica, el número de frutos rojos que se obtuvo y su tamaño no tuvo diferencia con las demás especies silvestres.

Se demostró que la utilización del sistema de edición genética CRISPR/Cas, puede ser utilizado de manera efectiva, para la eliminación completa de C-terminal de los genes

SIGAD2 y SIGAD3, con lo cual se puede conseguir el aumento de las concentraciones de GABA en el fruto de tomate rojo, con lo que se busca la obtención de alimentos de mejor calidad nutricional que pueden incluirse en la dieta de los humanos. El estudio también sugiere que se debe delimitar, e identificar, con precisión los genes en los cuales se realizará la edición, ya que algunas mutaciones, con puntos *off target* pueden incidir sobre tamaño de la plantas y ausencia de floración, pues algunas de las líneas mutantes presentaron estas condiciones en su desarrollo y producción. Se confirma, por lo tanto, que los sistemas CRISPR/Cas, son eficientes en la mutagénesis dirigida, para la generación de líneas de tomate (*Solanum lycopersicum*), con altos contenidos de ácido gamma-aminobutírico, GABA, en fruto, con fines a mejorar la alimentación y la salud humana.

Aplicación en producción animal

Una de las preocupaciones de la humanidad en el futuro será alimentar nuevas generaciones más ricas, urbanas y de mayor tamaño (FAO, 2009), para lo cual las nuevas biotecnologías de producción deben ofrecer herramientas de mejora en calidad y producción en la cadena pecuaria. El sistema de edición genética CRISPR/Cas se ha probado como herramienta útil en la producción pecuaria. Recientemente, un grupo de investigadores de la Unidad de Animales Transgénicos y de Experimentación y del Instituto de Reproducción Animal de Uruguay, han conseguido editar, mediante el sistema CRISPR/Cas, el genoma de células embrionarias de ovejas, con el objetivo de obtener mayor producción de carne (Crispo, y otros, 2015).

Para ello realizaron inyecciones citoplasmáticas del sistema CRISPR/Cas y sg RNA (RNA guía) en células embrionarias de ovejas Texel, con resultados prometedores para incrementar el crecimiento y tamaño del cuerpo. En un exquisito experimento, en donde se aseguró por diferentes metodologías que efectivamente la edición genómica funcionara, los investigadores uruguayos modificaron permanentemente el exón No. 1 del gen de la miostatina. La miostatina es una proteína que pertenece a la familia de factores de crecimiento y diferenciación celular TGF- β mutaciones específicas dentro del gen, en diferentes especies; incluidas las ovejas, dan el fenotipo conocido como de doble musculatura, en donde los animales tienen los cuartos traseros aumentados y carnes de mejor calidad.

El gen de la miostatina actúa como un regulador extracelular negativo y es clave en el crecimiento y desarrollo muscular, produciendo hipertrofia e hiperplasia de las células

musculares (Moreno , Sifuentes , De La Rosa, & Pereyra, 2008), de tal manera que editando este gen en diferentes especies, se podría aumentar la producción de carne en este sistema productivo. El grupo de investigación, inyectó el sistema CRSPR/Cas y el RNA guía para el exón 1 del gen de la miostatina en 572, embriones de ovejas recién fertilizados, incluyeron grupo control, luego trasplantaron 53 de los embriones modificados en hebras receptoras, realizaron la identificación y genotipificación de todas las células y de los individuos nacidos, análisis de Western Blotting para determinar la presencia de la proteína en la fibra muscular y la secuenciación del gen, para determinar las mutaciones realizadas. De los 53 embriones transferidos, se obtuvieron 22 nacimientos, de los cuales 10 (45%) contenían mutaciones dentro del gen. De estas 5 fueron homocigotos y 8 heterocigotos, las ovejas nacidas tuvieron deficiencia en la proteína miostatina y presentaron el fenotipo de doble musculatura, con un significativo aumento del peso y tamaño corporal, comparado con los animales silvestres. Estos resultados abren la puerta a la edición genética en animales de producción y permiten pensar en la posibilidad de obtener animales élites para programas de mejora en doble propósito carne/lana utilizando razas como la merino, buena productora de lana.

Aspectos legales de la edición genética con CRISPR/Cas

El avance, a pasos agigantados, de las nuevas técnicas de edición de genomas, especialmente CRISPR/Cas9, en todos los organismos, no ha dado tiempo para la reflexión sobre las implicaciones biológicas, éticas, morales y jurídicas a las que se podría enfrentar la humanidad en muy corto tiempo (Caballero & Rodríguez, 2016). La facilidad con la que se puede manipular la técnica, lo económico que se presenta en el mercado y la rapidez con la que se obtienen resultados, hace inferir que se encuentra al alcance de todos, cualquier laboratorio de biotecnología puede organizar su propio programa de edición genética, mientras que en las granjas o fincas productoras, cualquier biotecnólogo o persona formada en biología molecular, podrían desarrollar sus propias modificaciones genéticas en las especies biológicas que les interese (Santalaó-Pedro, 2017).

No existe un marco jurídico, a nivel global, que regule las modificaciones genómicas, más precisamente en las especies animales o vegetales, sólo normas territoriales para el uso comercial de organismos genéticamente modificados, mientras que el Convenio Europeo de 1997, luego de los avances en el conocimiento del genoma humano y sus posibles manipulaciones, establece, en el artículo 13, la prohibición de la modificación del genoma humano con cualquier fin, excepto el de intervenciones netamente de interés médico (Lacadena, 2017). En Colombia, la norma indica que no se pueden patentar invenciones que, al igual que el Convenio Europeo, vayan en busca de la modificación del genoma humano, no deja claro y deja a la deriva, la modificación de genomas vegetales y animales (Bermúdez & Lizarazo-Cortés, 2016), por lo tanto es necesario invitar a académicos, científicos, jurídicos y pensadores a comenzar el debate

acerca de esta perspectiva biotecnológica a que se ve enfrentada la humanidad del siglo XXI, pensando en las verdaderas posibilidades del sistema, teniendo en mente los principios éticos, económicos y jurídicos de su utilización.

Bibliografía

- Centeno, N. O., Coma, M. C., Rodríguez, E. J., & Zea, P. R. (2015). Revisión: 3 Terapia génica mediante nucleasas específicas: hacia la cirugía genética.
- Osakabe, Y., Watanabe, T., Sugano, S., Ueta, R., Ishihara, R., Shinozaki, K., & Osakabe, K. (2016). Optimization of CRISPR/Cas9 genome editing to modify abiotic stress responses in plants. *Scientific Reports*, 1-10.
- Ainsworth, C. (2015). A new breed of edits. *Nature*, 528(7581).
- Aldecoa, F., & Battilana, C. (2006). Genómica y proteómica: Un paso más. *Acta Médica Peruana*, 185-192.
- Alviso, A. I. (2017). Editar la vida: la revolución biotecnológica de CRISPR/CAS. *Ariel*, 1327.
- Anju, P., Moothedath, I., & Shree, A. B. (2014). Gamma amino butyric acid accumulation in medicinal plants without stress. *Ancient science of life*, 34(2), 68-72.
- Arora, L., & Narula, A. (2017). Gene editing and crop improvement using CRISPR/Cas9 system. *Frontiers in plant Science*, 1-20.
- Ayala, F. (2017). medicina y futuro biológico de la humanidad: de Andrés Laguna al siglo XXI. *Educación Médica*, 83-88.
- Bao, H., Chen, X., Lv, S., Jiang, P., Feng, J., Fan, P., . . . Li, Y. (2015). Virus-induced gene silencing reveals control of reactive oxygen species accumulation and salt tolerance in tomato by γ -aminobutyric acid metabolic pathway. *Plant, Cell and Environment*, 600-613.
- Barrangou, R., & Marraffini, L. A. (2014). CRISPR-Cas Systems: Prokaryotes Upgrade to Adaptive Immunity. *Molecular Cell*, 234-244.
- Becú-Villalobos, D. (2017). El Sistema Crispr/Cas9 ¿Cambiará el genoma de la humanidad? *MEDICINA (Buenos Aires)*, 521-523.
- Bermúdez, N., & Lizarazo-Cortés, Ó. (2016). Técnica de edición de genes CRISPR/Cas9. Retos jurídicos para su regulación y uso en Colombia. *Revista la propiedad inmaterial*, 79-110.

- Bolívar, F. G. (2007). *Fundamentos y casos de éxito de la biotecnología moderna* (2 ed.). El Colegio Nacional.
- Butler, N. M., Atkins, P. A., Voytas, D. F., & Douches, D. S. (2015). Generation and Inheritance of Targeted Mutations in Potato (*Solanum tuberosum*L.) Using the CRISPR/Cas System. *PLOS ONE*, 1-12.
- Caballero, D., & Rodríguez, C. (2016). La revolución de CRISPR/ Cas9. *Ciencia y sociedad*, 8-10.
- Callejas, M., Escobar, M., Hernández, D., Rodríguez, M., Villacorta, A., & Rodríguez, S. (2018). Aplicación del sistema CRISPR/Cas9 como futura opción terapéutica para el tratamiento del cáncer. *SINAPSIS UJMD*, 42-50.
- Cao, H. X., Wang, W., Le, H. T., & Vu, G. T. (2016). The Power of CRISPR-Cas9-Induced Genome Editing to Speed Up Plant Breeding. *International Journal of Genomics*, 1-10.
- Casacuberta, J. M., & Puigdomènech, P. (s. f.). *Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular*. Recuperado el 29 de 01 de 2018, de <http://www.sebbm.es/revista/articulo.php?id=270&url=las-nuevas-herramientas-de-edicion-genomica-y-la-mejora-genetica-de-plantas>
- Chávez-Jacobo, V. M. (2018). El sistema de edición genética CRISPR/Cas y su uso como antimicrobiano específico. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 116-123.
- Corbyn, Z. (2015). Biology's big hit. *Nature*, 54-55.
- Corbyn, Z. (2015). Biology's big hit. *Nature*, 528(7581).
- Corvolán, A. (2002). Biología molecular en Infectología Parte I: Desarrollo y metodologías. *Revista Chilena de Infectología*, 14-24.
- Crispo, M., Mulet, A. P., Tesson, L., Barrera, N., Cuadro, F., dos Santos-Neto, P. C., & Menchaca, A. (2015). Efficient generation of myostatin knock-out sheep using CRISPR/Cas9 technology and microinjection into zygotes. *PloS one*.
- Díaz, P., Zárate, C. A., & Bernal, A. (2016). Infección de callo embriogénico friable de yuca con *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* (Xam). *Revista Colombiana de Biotecnología*, 66-73.

- Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2014). The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, 346(6213). doi:1258096
- FAO. (2009). *How to Feed the World in 2050*. Rome: High-Level Expert Forum.
Obtenido de
http://www.fao.org/fileadmin/templates/wsfs/docs/expert_paper/How_to_Feed_the_World_in_2050.pdf
- Giddings, L. V. (08 de 01 de 2017). "GM" Food Labels, Gene Editing & the Future of Agriculture. Pennsylvania, EE UU: Information, Technology, & Innovation Foundation.
- Gilbert, L. A., Horlbeck, M. A., Adamson, B., Villalta, J. E., Chen, Y., & Qi, L. S. (2014). Genome-Scale CRISPR-mediated control of gene repression and activation. *Cel*, 159(3), 647-661.
- Gilbert, L., Larson, M., Morsut, L., Liu, Z., Brar, G., Torres, S., . . . Qi, L. (2013). CRISPR-Mediated Modular RNA-Guided Regulation of Transcription in Eukaryotes. *Cell*, 442-451.
- Gross, M. (2016). Harvest time for CRISPR-Cas? *Current Biology*.
- Gutiérrez-Albenda, D., & Salazar-Sánchez, E. (2017). CRISPR-Cas: Utilidad clínica de la edición genómica como opción terapéutica. *Revista Clínica de la Escuela de Medicina UCR – HSJD*, 7(VI).
- Gutiérrez-Albenda, D., & Salazar-Sánchez, L. (2017). TEMA 2017: CRISPR-Cas: Utilidad clínica de la edición genómica como opción terapéutica. *Revista Clínica Escuela de Medicina UCR-HSJD*, 7(6).
- Hansen, K., Coussens, M. J., Sago, J., Subramanian, S., Gjoka, M., & Briner, D. (2012). Genome Editing with CompoZr Custom Zinc Finger Nucleases (ZFNs). *Journal of visualized experiments*, 3791-3304 .
- Horvath, P., & Barrangou, R. (2010). CRISPR/Cas, the Immune System of Bacteria and Archaea. *Science*, 327, 167-170.
- Hryhorowicz, M., Lipinski, D., Zeyland, J., & Slomsky, R. (2017). CRISPR/Cas9 Immune System as a Tool for Genome Engineering. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis*, 65(3), 233-240.
- Hsu, P. D., Lander, E. S., & Zhang, F. (2014). Development and Applications of CRISPR-Cas9 for Genome Engineering. *Cell*, 157(6), 1262-1278.

- Illumina. (09 de 02 de 2017). *Illumina*. Obtenido de <https://www.illumina.com/science/publication-reviews.html?scid=2017301VU1>
- Jiang, W., Zhou, H., Bi, H., Fromm, M., Yang, B., & Weeks, D. P. (2013). Demonstration of CRISPR/Cas9/sgRNA-mediated targeted gene modification in Arabidopsis, tobacco, sorghum and rice. *Nucleic acids research*, *41*(20), e188-e188.
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J., & Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, *337*, 816-821.
- Jinek, M., East, A., Cheng, A., Lin, S., Ma, E., & Doudna, J. (2013). RNA-programmed genome editing in human cells . *e-Life*, 1-9.
- Kennedy, E. M., & Cullen, B. R. (2015). Bacterial CRISPR/Cas DNA endonucleases: A revolutionary technology that could dramatically impact viral research and treatment . *Virology*, 213-220.
- Khan, S., Mahmood, M. S., ur Rahman, S., Zafar, H., Habibullah, S., khan, Z., & Ahmad, A. (2018). CRISPR/Cas9: the Jedi against the dark empire of diseases. *Journal of Biomedical Science*, 25-29.
- Kinnersley, A. M., & Turano, F. J. (2000). Gamma aminobutyric acid (GABA) and plant responses to stress. *Critical Reviews in Plant Sciences*, *19*(6), 479-509.
- Komor , A. C., Badran, A. H., & Liu, D. R. (2017). CRISPR-Based technologies for the manipulation of eukaryotic genomes. *Cell*, *168*(1-2), 20-36.
- Kotsias, A. B. (2003). el jubileo del descubrimiento de la doble hélice. *Medicina (Buenos Aires)*, 447-449.
- Lacadena, J. R. (2017). Edición genómica: ciencia y ética. *Revista Iberoamericana de Bioética*, 01-14.
- Lal, S., Cheung, E. C., Zarei, M., Preet, R., Chand, S. N., Mambelli-Lisboa, N. C., . . . Brody, J. R. (2017). CRISPR knockout of the HuR gene causes a xenograft lethal phenotype. *Molecular Cancer Research*, *15*(6), 696-707.
- Lammoglia-Cobo, M. F., Lozano-Reyes, R., García-Sandoval, C. D., Avilez-Bahena, C. M., Trejo-Reveles, V., Muñoz-Soto, R. B., & López-Camacho, C. (2016). La revolución en ingeniería genética: sistema CRISPR/Cas . *Investigaion en discapacidad*, 116-128.

- Li, D., Qiu, Z., Shao, Y., Chen, Y., Guan, Y., Liu, M., . . . Liu, M. (2013). Heritable gene targeting in the mouse and rat using a CRISPR-Cas system. *Nature Biotechnology*, *31*, 681-683.
- Li, R., Li, R., Li, X., Fu, D., Zhu, B., Tian, H., . . . Zhu, H. (2018). Multiplexed CRISPR/Cas9-mediated metabolic engineering of c-aminobutyric acid levels in *Solanum lycopersicum*. *Plant Biotechnology Journal*, 415–427.
- Liang, Z., Zhang, K., Chen, K., & Gao, C. (2014). Targeted Mutagenesis in *Zea mays* Using TALENs and the CRISPR/Cas System. *Journal of Genetics and Genomics*, 63-68.
- Loenen, W., Dryden, D., Raleigh, E., Wilson, G., & Murray, N. (2013). Highlights of the DNA cutters: a short history of the restriction enzymes. *Nucleic Acids Research*, 3-19.
- López, F. (2015). CRISPR, el sueño divino hecho realidad. *Instituto de Fisiología Celular*, 58(4).
- López, F. (2015). CRISPR, el sueño divino hecho realidad. *Revista de la Facultad de Medicina de la UNAM*, 55-59.
- Luria, S. E. (1953). Host-induced modifications of viruses. *Cold Spring Harbor Laboratory Press.*, *18*, 237-244.
- Mae, N., Makino, Y., Oshita, S., Kawagoe, Y., Tanaka, A., & Takayama, M. (2012). Accumulation mechanism of γ -aminobutyric acid in tomatoes (*Solanum lycopersicum* L.) under low O₂ with and without CO₂. *Journal of agricultural and food chemistry*, *60*(4), 1013-1019.
- Martin, D. L., & Rimvall, K. (1993). Regulation of γ -Aminobutyric Acid Synthesis in the Brain. *Journal of neurochemistry*, *60*(2), 395-407.
- Martínez, F. J. (15 de junio de 2016). Sistemas CRISPR-Cas, edición de genomas y mucho más. Seminario de Francisco J. Martínez Mojica. (Á. Nadal, Entrevistador) Obtenido de <https://www.youtube.com/watch?v=BiIl9MBgsAA>
- Mathews, C. K., Van Holde, K. E., & Ahern, K. G. (2002). *Bioquímica*. Pearson Education.
- Medina, L., Rebollar, J. E., Gallego, A. L., Velázquez, A., Olvera, L., Gutiérrez, R. M., . . . Hernández, I. (2011). The CRISPR/Cas immune system is an operon

regulated by LeuO, H-NS and LRP in *Salmonella enterica* serovar Typhi.
Journal of bacteriology.

Méndez, L., & Garro, G. (2018). Una nueva era de la biotecnología en el mejoramiento genético. *Investiga TEC*, 2.

Miller, J. C., Tan, S., Qiao, G., Barlow, K. A., Wang, J., Xia, D. F., . . . Rebar, E. J. (2011). A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nature Biotechnology*, 143-150.

Mohanraju, P., Makarova, K. S., Zetsche, B., Zhang, F., Koonin, E. V., & van der Oost, J. (2016). Diverse evolutionary roots and mechanistic variations of the CRISPR-Cas systems. *Science*, 353(6299).

Mojica, F. (23 de Mayo de 2016). Entrevista a Francisco Mojica. MetodeTV. Obtenido de <https://www.youtube.com/watch?v=5Ozsup2CBN4&t=45s>

Mojica, F. J., & Montoliu, L. (2016). On the origin of CRISPR-Cas technology: From prokaryotes to mammals. *Cells*, 24(10).

Morales, F. (2018). Terapia génica en el arsenal de terapéutica de la enfermedad oncológica. *Revista Clínica de la Escuela de Medicina de la Universidad de Costa Rica*, 8(1), 11-17.

Moreno, V. R., Sifuentes, A. M., De La Rosa, X. F., & Pereyra, B. (2008). Evaluación de regiones polimórficas del gen de la miostatina en ganado Beefmaster. *Archivos de medicina veterinaria*, 40(1), 59-63.

Nishimsu, H., & Nureki, O. (2017). Structures and mechanisms of CRISPR ARN-guided effector nucleases. *Current opinion in structural biology*, 43, 68-78.

Noman, A., Aqeel, M., & He, S. (2016). CRISPR/Cas9: Tool for qualitative and quantitative plant genome editing. *Frontiers in plant Science*, 7(1740).

Nonaka, S., Arai, C., Takayama, M., Matsukura, C., & Ezura, H. (2017). Efficient increase of γ -aminobutyric acid (GABA) content in tomato fruits by targeted mutagenesis. *Scientific Reports*, 1-14.

Oh, J. N., Choi, K. H., & Lee, C. K. (2018). Multi-resistance strategy for viral diseases and in vitro short hairpin RNA verification method in pigs. *Asian-Australasian journal of animal sciences*, 31(4), 489.

- Palomo, I., Moore-Carrasco, R., Carrasco, G., Villalobos, P., & Guzmán, L. (2010). El consumo de tomate previene el desarrollo de enfermedades cardiovasculares y cáncer: antecedentes epidemiológicos y mecanismos de acción. *IDESIA Chile*, 28(3), 121-129.
- Pettinari, M. J. (2016). La revolución de los CRISPR, o cómo nuevamente una rareza microbiana se convierte en una herramienta revolucionaria que permite editar cualquier genoma. *Química Viva*, 7-10.
- Port, F., Chen, H. M., Lee, T., & Bullock, S. L. (2014). Optimized CRISPR/Cas tools for efficient germline and somatic genome engineering in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(29), E2967-E2976.
- 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.
- Raht, D., Amlinger, L., Raht, A., & Lundgren, M. (2015). The CRISPR-Cas immune system: biology and applications. *Biochimie*, 117, 119-128.
- 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.
- Rengifo, A. C., & Torres-Fernández, O. (2007). Disminución del número de neuronas que expresan GABA en la corteza cerebral de ratones infectados con rabia. *Biomédica*, 548-558.
- Reyes, A., Olivera, L., & Guerra, A. (2016). El promisorio camino de la tecnología CRISPR/Cas9 en la edición genómica. *Revista de ciencias*, 86-96.
- Riesgo, J. R. (2016). De las trincheras defensivas bacterianas a la edición eficiente de genomas. *Revista de Educación Bioquímica*, 38-42.
- Roberts, R. J. (2005). How restriction enzymes became the workhorses of molecular biology. *PNAS*, 5905-5908.
- Romay, G., & Bragard, C. (2017). Antiviral defenses in plants through genome editing. *Frontiers in Microbiology*, 8.
- Saito, T., Matsukura, C., Sugiyama, M., Watahiki, A., Ohshima, I., Iijima, Y., & Nishimura, S. (2008). Screening for γ -aminobutyric acid (GABA)-rich tomato

- varieties. *ournal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 77(3), 242-250.
- Salamanca, U. d. (s.f.). *Universidad de Salamanca*. Recuperado el 20 de 06 de 2018, de <https://campus.usal.es/~dbbm/modmol/modmol04/mm04t02.htm>
- Santalaó-Pedro, J. (2017). Edición genómica. La hora de la reflexión. *Revista de Bioética y derecho*, 157-165.
- Santos, A., Manzanarez, C. G., Reyes, R., Hernández, A., Vallejo, B., & González, A. F. (2018). Ácido γ -Aminobutírico (GABA) producido por bacterias ácido lácticas en alimentos fermentados. *Interciencia*, 175-181.
- Schimpl, S., & Puchta, H. (2016). Revolutionizing plant biology: multiple ways of genome engineering by CRISPR/Cas. *Plant methods*, 12(1), 8.
- Shimatani, Z. K. (2017). targeted base editing in rice and tomato using a CRISPR-Cas9 cytidine deaminase fusion. *Nature*, 35(5).
- Tycko, J., Meir, V. E., & Hsu, P. D. (2016). Methods for optimizing CRISPR-Cas9 genome editing specificity. *Cell*, 63(3), 355-370.
- Van Der Oost, J., Westra, E. R., Jackson, R. N., & Wiedenheft, B. (2014). Unravelling the structural and mechanistic basis of CRISPR-Cas. *Nature reviews Microbiology*, 12(7), 479-492.
- Van Giau, V., Lee, H., Shim, K. H., Bagyinszky, E., & An, S. S. (2018). Genome-editing applications of CRISPR-Cas9 to promote in vitro studies of Alzheimer's disease. *Clinical Interventions in Aging*, 221-233.
- Vargas Hernández, J. A., Hinojosa Juárez, A. C., & Mendieta Zerón, H. (2017). El sistema CRISPR-CAS. *Inteligencia Epidemiológica*, 27-37.
- Vetcher, D. (2017). Impacto y oportunidad de CRISPR-Cas9 en Cardiología. *Revista Argentina de Cardioangiología Intervencionista*, 62-66.
- Waltz, E. (2016). Gene-edited CRISPR mushroom escapes US regulation. *Nature News*, 532(7599), 293.
- Waltz, E. (2015). Gene-edited CRISPR mushroom escapes US regulation. *Nature*, 528(7581).

- Wang, P., Zhang, J., Sun, L., Ma, Y., Xu, J., Liang, S., . . . Zhang, X. (2018). High efficient multisites genome editing in allotetraploid cotton (*Gossypium hirsutum*) using CRISPR/Cas9 system. *Plant Biotechnology Journal* , 137–150.
- Watanabe, M., Maemura, K., Kambara, K., Tamayama, T., & Hayasaki, H. (2002). GABA and GABA Receptors in the Central Nervous System and Other Organs. *ScienceDirect*, 1-14.
- Westerhoff, H. V., & Palsson, B. O. (2004). The evolution of molecular biology into systems biology. *Nature*, 1249-1252.
- Wolter, F., & Puchta, H. (2017). Knocking out consumer concerns and regulator's rules: efficient use of CRISPR/Cas ribonucleoprotein complexes for genome editing in cereals. *Genome biology*, 18(1), 43.
- Wright, A. V., & Doudna, J. A. (2016). Protecting genome integrity during CRISPR immune adaptation. *Nature Structural and Molecular Biology*, 23(10), 876-883.
- Wright, A. V., Núñez, J. K., & Doudna, J. (2016). Biology and applications of CRISPR/Cas systems: Hamessing nature'ss toolbox for genome engineering. *Cell*, 164(1), 29-44.
- Xiao, A., Wang, Z., Hu, Y., Wu, Y., Luo, Z., Yang, Z., . . . Zhang, B. (2013). Chromosomal deletions and inversions mediated by TALENs and CRISPR/Cas in zebrafish. *Nucleic Acids Research*, 41(14), e141-e141.
- Zhen, S., Hua, L., Takahashi, Y., Narita, S., Liu, Y. H., & Li, Y. (2014). In vitro and in vivo growth suppression of human papillomavirus 16-positive cervical cancer cells by CRISPR/Cas9. *Biochemical and biophysical research communications*, 450(4), 1422-1426.
- Zischewsky, J., Fischer, R., & Bortesi, L. (2017). Detection of on-target and off-target mutations generated by CRISPR/Cas9 and other sequence-specific nucleases. *Biotechnology Advances*, 95-104.
- Zúñiga Orozco, A. (2017). Tecnología CRISPR-Cas9: una herramienta aplicable en la agricultura de Costa Rica. *Repertorio Científico*, 20(2).