



LA NUEVA REVOLUCIÓN DE LA EDICIÓN GÉNICA: CRISPR

2ª EDICIÓN

EL ORIGEN DE CRISPR

Los primeros nombres que se relacionan con “CRISPR” suelen ser los de Jennifer Doudna y Emmanuelle Charpentier, premio Nobel de Química en 2020, coinventoras de la tecnología CRISPR-Cas9. Sin embargo, **el mecanismo CRISPR fue descubierto originalmente en los años 90 por Francisco Mojica, microbiólogo y profesor de la Universidad de Alicante⁽¹⁾.**

En 1992, Mojica estaba trabajando en su tesis secuenciando el ADN de microorganismos halófilos pertenecientes a la familia Archaea. Al replicar su ADN, descubrieron que poseían una serie de repeticiones espaciadas regularmente en zonas concretas, a las que llamaron “repeticiones en tándem”. No fue hasta 2001 cuando Mojica acuñó el término CRISPR, denominando a estas zonas como **“Repeticiones Palindrómicas Cortas Agrupadas y Regularmente Interespaciadas”**.

En la década de los 2000, al secuenciar una cepa particular de *E. coli*, Mojica descubrió que entre esas regiones espaciadoras de CRISPR existían fragmentos de **ADN vírico**. Estas secuencias de ADN vírico protegían a los organismos procariotas de ser infectados por virus que llevaban la misma secuencia en su genoma; el virus simplemente no podía infectar la célula⁽⁴⁾.

Entonces Mojica se dio cuenta de que había descubierto un mecanismo adaptativo del sistema inmunológico de los procariotas. El estudio finalmente se publicó en el *Journal of Molecular Evolution* en 2005.

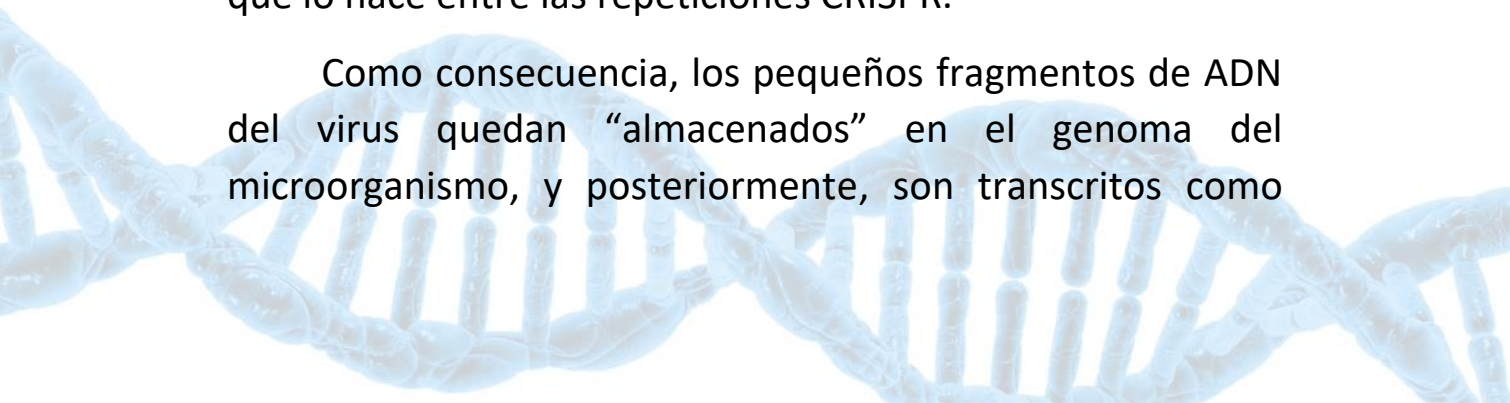
La tecnología CRISPR se ha convertido en una verdadera revolución en el campo de la edición génica, permitiendo editar o corregir una región del genoma de cualquier célula con una gran precisión y exactitud. Esta tecnología fue aplicada por primera vez en 2012 y desde entonces el número de nuevas aplicaciones no ha parado de crecer.

¿QUÉ ES CRISPR?

CRISPR es una **técnica de edición génica** que permite cortar el ADN en un sitio específico para después editarlo. Como explicábamos antes, el nombre CRISPR es un acrónimo de *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* (Repeticiones Palindrómicas Cortas Agrupadas y Regularmente Interespaciadas). Esto significa que CRISPR son **segmentos de ADN con repeticiones** cortas de secuencias de bases nitrogenadas separadas regularmente por otras secuencias en medio llamadas espaciadores.

La tecnología CRISPR deriva del **sistema inmune natural** de los procariotas, en los que actúa como una defensa innata. Este **mecanismo de defensa** se basa en que cuando un virus infecta a un microorganismo, el ADN viral es fragmentado dentro de la célula e incorporado al genoma del microorganismo, pero no es incorporado al azar, sino que lo hace entre las repeticiones CRISPR.

Como consecuencia, los pequeños fragmentos de ADN del virus quedan “almacenados” en el genoma del microorganismo, y posteriormente, son transcritos como



pequeños ARNs (ácidos ribonucleicos). Estos ARNs son usados como guía de CRISPR, como se verá después en la figura 1, para dirigir la degradación de ácidos nucleicos en infecciones virales posteriores, haciendo que la información genética del virus se destruya y, por lo tanto, no pueda continuar su ciclo de vida dentro de la célula⁽³⁾.

En resumen, cuando un virus infecta a una bacteria, su ADN se fragmenta y se incluye en el genoma del microorganismo, para después dar lugar a pequeños ARNs (mediante el proceso de transcripción), que van a actuar como guías de CRISPR, para que este sistema reconozca y destruya el ADN del virus en una infección posterior

¿CÓMO FUNCIONA CRISPR?

Cuando un virus desconocido infecta a una bacteria se crea un **espaciador** (fragmento de ADN derivado del virus) que es incorporado al genoma de la bacteria entre otros espaciadores existentes (que derivan del ADN de virus que han atacado previamente a la bacteria).

La **secuencia CRISPR** es después transcrita para generar **moléculas de ARN-CRISPR**. Cuando se produce una nueva infección viral, este ARN-CRISPR guía a la maquinaria molecular hasta la secuencia de ADN viral que coincide con la que tiene la bacteria en el espaciador. Al unirse, la propia

maquinaria celular destruye el ADN viral, evitando así la infección (**figura 1**).

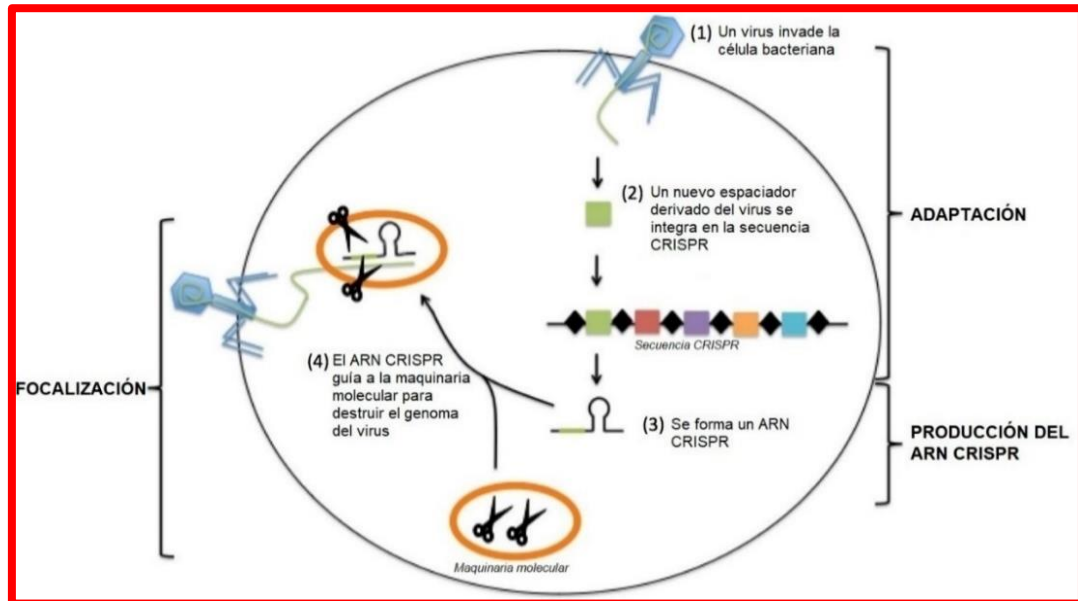


Figura 1. *Pasos de la inmunidad mediada por el sistema CRISPR.* Las regiones CRISPR están compuestas por repeticiones de ADN pequeño (representadas por los rombos negros) y espaciadores (representados por cuadrados de colores). Figura adaptada de Molecular Cell 54, April 24, 2014 (5).

Como se puede ver en la figura 1, el funcionamiento del sistema inmune CRISPR se puede resumir en tres procesos fundamentales ⁽⁶⁾:

- Proceso de **adaptación**: cuando un ADN de un virus que ha infectado la bacteria es cortado en segmentos pequeños que son insertados en la secuencia CRISPR como nuevos espaciadores.
- Proceso de **producción de ARN-CRISPR**: las repeticiones CRISPR y los espaciadores del ADN de la bacteria pasan por un proceso de transcripción para dar lugar a una

cadena de ARN complementaria. Este ARN resultante se corta en fragmentos que reciben el nombre de ARN-CRISPR.

- Proceso de **focalización (o *targeting*)**: los ARN-CRISPR guían a la maquinaria molecular para destruir el material viral. Actúan como guías ya que al ser complementaria de la región espaciadora de la bacteria, también lo será del genoma del virus.

A modo de resumen, los espaciadores derivados de genomas de virus que han infectado a una bacteria sirven como una “memoria genética”, por lo que, en un ataque del mismo virus, el sistema CRISPR actúa como defensa cortando cualquier ADN viral que corresponda con la secuencia espaciadora, protegiendo así a la célula de una nueva infección. Si un virus “nuevo” ataca a la bacteria, se crea un nuevo espaciador que se inserta en las secuencias CRISPR

¿QUÉ ES CRISPR-Cas y CRISPR-Cas9?

CRISPR-Cas es el nombre que recibe el sistema formado por CRISPR y las proteínas asociadas Cas (en inglés, *CRISPR-associated*) que confiere inmunidad adaptativa contra elementos exógenos como virus en muchas bacterias y la mayor parte de las arqueas. Las proteínas Cas son **nucleasas** que cortan el ADN de forma específica guiadas por secuencias de ARN ⁽⁵⁾.

Los sistemas CRISPR-Cas son muy diversos, ya que cada bacteria y cada arquea tiene el suyo propio. Por ello, se ha creado una clasificación en la que los sistemas se dividen en dos clases, que a su vez contienen diferentes tipos, que se diferencian según las características de las nucleasas. Destacan los sistemas que pertenecen a **la clase II**, ya que han sido modificados por ingeniería genética para actuar de forma más robusta con el fin de realizar modificaciones más eficaces en el genoma de múltiples sistemas eucariotas, como por ejemplo las células humanas ⁽⁷⁾.

CRISPR-Cas9 es uno de los sistemas que se encuentra dentro de los de clase II, y deriva de una bacteria llamada *Streptococcus pyogenes*. Este sistema que ha sido adaptado para la edición de genomas está compuesto por la proteína **Cas9** (nucleasa asociada a CRISPR) y un **sgARN** (*single-guided RNA*) que actúa como ARN guía dirigiendo a Cas9 al sitio diana. Este sgARN es de pequeño tamaño, ya que está compuesto por tan solo 20 nucleótidos ⁽⁸⁾. La nucleasa y el ARN guía o sgARN funcionan asociados formando un complejo (**figura 2**).

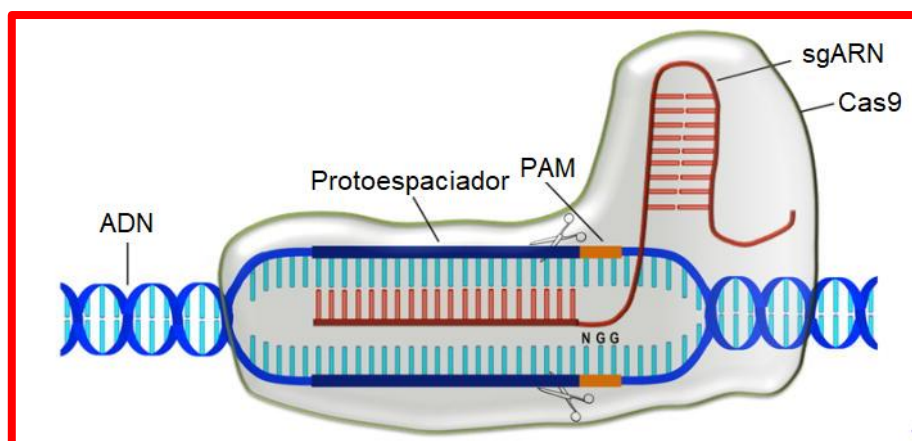


Figura 2. Representación esquemática del sistema CRISPR-Cas 9. El protoespaciador es la región del ADN que se quiere

modificar y aparea con el sgARN correspondiente. La secuencia NGG, base nitrogenada cualquiera-guanina-guanina, se encuentra siempre tras la secuencia del sgARN, y recibe el nombre de PAM (en español, Motivo Adyacente al Protoespaciador). Las tijeras representan los lugares de corte de Cas9. Figura adaptada de The Journal of Eukaryotic Microbiology 63, September, 2016 (9).

Una vez formado el complejo y reconocido el ADN que se quiere modificar por el sgARN (ya que como se ve en la figura 2 son complementarios y aparean), Cas9 produce un corte de la doble cadena de ADN en lugares concretos de la secuencia.

Posteriormente, **la rotura del ADN es reparada por distintos mecanismos** de la propia célula. Hay tres mecanismos principales, cada uno resulta en un tipo de mutación diferente, (**figura 3**), que pueden ser *indels* (inserciones o deleciones de pequeño tamaño), inserciones o deleciones ⁽⁹⁾.

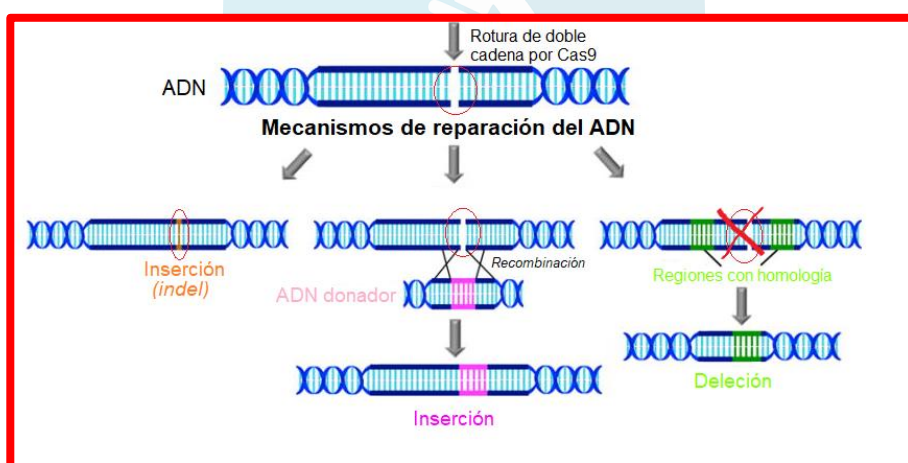


Figura 3. Representación esquemática de los posibles mecanismos de reparación del ADN y sus resultados. El ADN donador puede ser añadido de manera artificial para conseguir la inserción de un gen de interés. Figura adaptada de The Journal of Eukaryotic Microbiology 63, September, 2016 (9).

La idea básica es que el sistema CRISPR-Cas9 funciona gracias al complejo formado por la nucleasa Cas9 y un ARN guía (transcrito a partir de las secuencias CRISPR). Este último reconoce a la secuencia de ADN que se quiere modificar, y Cas9 realiza cortes en dicho ADN.

Posteriormente, la maquinaria celular repara estos cortes y como resultado se producen mutaciones (inserciones o deleciones). Se puede dirigir el que se produzca una inserción de un gen determinado si se proporciona a la maquinaria una molécula de ADN donador con el gen de interés.

EDICIÓN GENÉTICA VS MODIFICACIÓN GENÉTICA

La edición genética (mutagénesis -CRISPR-) no es lo mismo que la modificación genética (transgénesis) y conviene tener muy claras las diferencias.

Mientras que la transgénesis implica la inclusión de material genético exógeno de otro organismo, las técnicas de CRISPR, al igual que el resto de las técnicas de edición génica, **no incluyen material genético externo**, sino que modifican el material genético propio del organismo. Por lo tanto, las técnicas CRISPR no obtienen organismos transgénicos.

La mayoría de las aplicaciones de CRISPR, especialmente en agricultura, producen **caracteres idénticos a los encontrados en la naturaleza**, que podrían derivar de la mejora vegetal convencional o del azar de la propio medio

ambiente. Es prácticamente imposible distinguir una variedad convencional de una variedad editada genéticamente con CRISPR.

Una de las grandes ventajas de las técnicas de edición genética, y en especial de CRISPR, es que son más precisas, rápidas y baratas que la modificación genética, abriendo un abanico inmenso de posibilidades en muy diversos ámbitos de investigación, desde la salud hasta la agricultura.

SITUACIÓN LEGAL DE CRISPR

En febrero de 2017, el Grupo Europeo de Ética en la Ciencia y las Nuevas Tecnologías (EGE) señaló que el debate sobre la edición del genoma debe abordar no solo la seguridad, sino también cuestiones más amplias como la percepción del riesgo que tiene la sociedad sobre esta herramienta.

En julio de 2018, el **Tribunal de Justicia de la Unión Europea (TJUE)** dictaminó que los organismos obtenidos mediante mutagénesis se debían regular bajo la legislación de los organismos modificados genéticamente o transgénicos; y, por lo tanto, dentro del alcance de la Directiva de Liberación Deliberada 2001/18 / EC ⁽¹⁰⁾.

Como explicábamos antes, un organismo transgénico no es lo mismo que un organismo editado genéticamente. En el primero se ha introducido un gen que no es propio de la especie. En el segundo se altera la secuencia de una forma determinada, modificando las características de un organismo sin añadir ningún gen externo.

Equiparar legalmente ambos organismos hace que para registrar una nueva variedad obtenida por CRISPR, por ejemplo, sea necesario realizar un dossier de pruebas de toxicidad que económicamente muy pocas empresas de biotecnología se pueden permitir. **Si no se desarrolla en un futuro próximo un nuevo marco legal que se ajuste más a la realidad, muchas empresas de biotecnología se verán obligadas a retirarse del mercado de la innovación en ingeniería genética⁽¹¹⁾.**

Todas las Academias Europeas (ALLEA) han manifestado que restringir la posibilidad de utilizar la edición del genoma mediante la aplicación de la legislación sobre OMG tendrá consecuencias negativas considerables para la agricultura, la sociedad y la economía. Estar sujeto a restricciones continuas pueden obstaculizar la selección de cultivos más productivos, diversos y resistentes al clima con una huella ambiental reducida.

Las academias reclaman que estas plantas deberían estar reguladas de manera similar a las obtenidas mediante técnicas clásicas. Esta conclusión corresponde a que las plantas que fueron sometidas a ediciones del genoma no añaden ningún ADN extraño y son tan seguras como estas últimas.

Estas academias facilitaron a los responsables políticos europeos y a la sociedad una guía con la mejor evidencia científica disponible para la legislación que tiene debidamente en cuenta los conocimientos científicos más recientes⁽¹²⁾.



APLICACIONES ACTUALES DEL SISTEMA CRISPR-Cas9

Las aplicaciones de la tecnología CRISPR-Cas9 en la actualidad son numerosas, ya que el uso de su mecanismo tiene potencial en todos los ámbitos de la vida. Se pueden usar los sistemas CRISPR-Cas9 para **reconocer secuencias de ADN específicas**, es decir, en lugar de usar el ADN viral como espaciador, se pueden diseñar otras secuencias espaciadoras que se transcriban dando lugar a ARNs guía, que reconozcan determinados genes de interés por complementariedad. Gracias a esto, se puede modificar cualquier gen ya sea introduciendo mutaciones nuevas como corrigiendo mutaciones existentes, o incluso silenciando la expresión de dicho gen (**figura 4**).

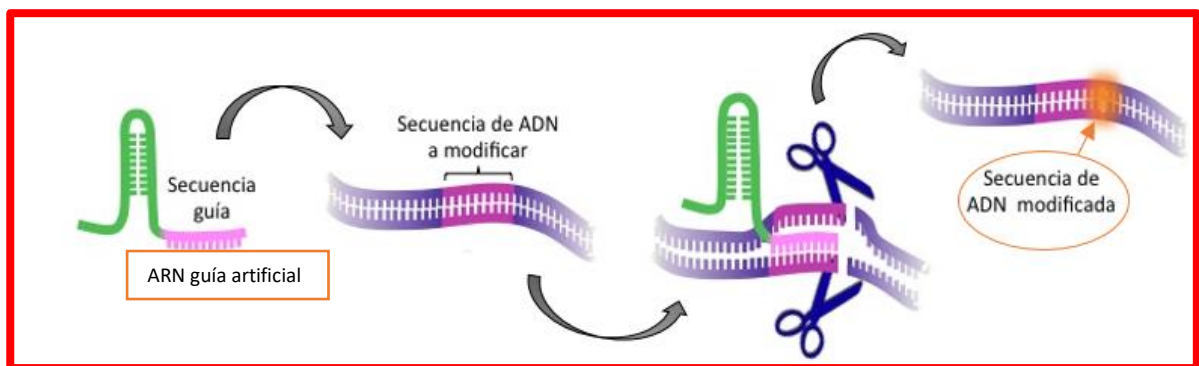


Figura 4. Representación esquemática de la modificación de ADN mediante CRISPR. La secuencia de ADN a modificar es la secuencia de un gen de interés. Las tijeras representan los cortes de la nucleasa Cas9.

Una de las áreas en las que esta tecnología de edición génica se está usando, es en la **producción animal**, tanto

para mejorar los productos derivados del ganado como para mejorar la salud animal ⁽¹³⁾.

Las modificaciones genéticas permiten acelerar la selección genética (antes basada en la mejora clásica) en ganado ovino y porcino, mejorando el perfil nutricional de los productos obtenidos. Por otra parte, en vacas, mediante CRISPR se ha conseguido conferir resistencia a la tuberculosis, y en el caso de los cerdos, a la fiebre porcina africana, con todos los beneficios asociados. Una mayor resistencia a las enfermedades genéticas e infecciosas supone una mayor productividad de las granjas y una mejor calidad de vida animal y, en algunos casos, reduce la posibilidad de transmisión de enfermedades a los humanos (figura 5).

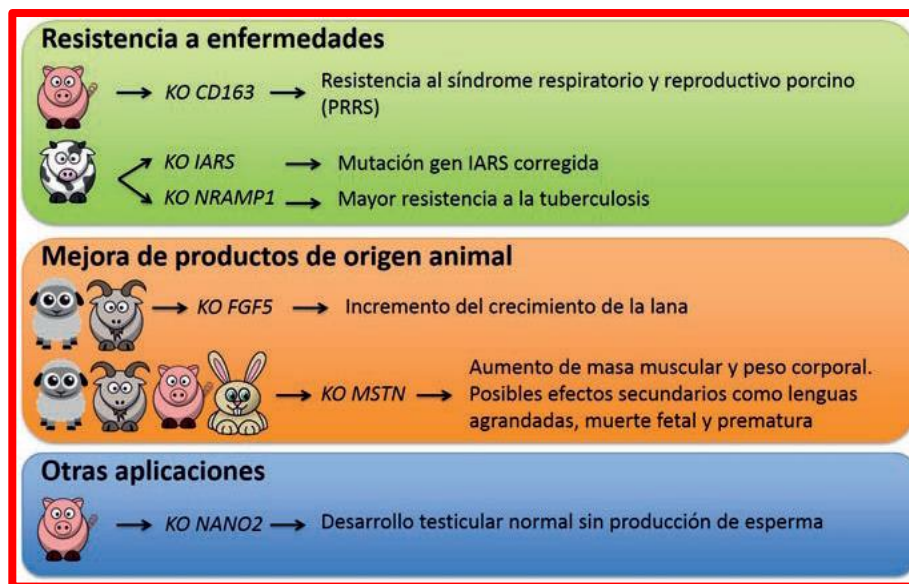


Figura 5. Aplicaciones en Producción animal del sistema CRISPR-Cas9 en animales domésticos. Se indica si se ha llevado a cabo la inserción de un gen (KI o knockin) o inactivación (KO o knockout) y los resultados observados (14).

Otras aplicaciones relevantes de CRISPR-Cas9 se engloban dentro del **área de la biomedicina**, que es uno de los campos junto a la agricultura donde se considera que tiene un mayor potencial. Mediante esta técnica de edición de genomas se ha acelerado el proceso de **generación de organismos modelo para el estudio de enfermedades**. Esta aplicación se basa en crear un modelo animal en el que se reproduzcan mediante CRISPR-Cas9 las mismas mutaciones encontradas en un paciente, o en una población determinada.

De esta forma, se puede estudiar con mayor precisión y seguridad tanto la enfermedad como su pronóstico ⁽¹⁵⁾. Un ejemplo de esta aplicación son los llamados “**ratones avatar**”, ratones a los que se traslada una determinada mutación existente en una persona, para validar en ellos la toxicidad y la eficacia de un tratamiento determinado antes de aplicárselo a una persona.

Por otra parte, aunque CRISPR-Cas9 se está usando principalmente en biomedicina como una herramienta de investigación de enfermedades, también se está tratando de aplicar su potencial para **tratar desórdenes genéticos**. Los últimos experimentos llevados a cabo han conseguido corregir enfermedades genéticas en ratones adultos, lo que resulta alentador ya que estos resultados podrían extrapolarse a humanos.



APLICACIONES POTENCIALES DE LAS TECNOLOGÍAS CRISPR

Gracias a su simplicidad, la tecnología CRISPR es una de las más prometedoras en el campo de la modificación de genomas. De hecho, se considera que esta técnica ha abierto la era de la **“cirugía molecular”**. A pesar de que se está investigando cómo aplicar CRISPR para el tratamiento de numerosas enfermedades, es una técnica muy novedosa, por lo que aún no ha alcanzado todo su potencial ⁽¹⁶⁾. Entre las enfermedades que se quieren curar se encuentran las causadas por la mutación de un solo gen como la **fibrosis quística**, y las enfermedades más complejas como **el VIH, la malaria o el cáncer** ⁽¹⁷⁾.

La potencial aplicación para reducir la prevalencia de la malaria se basa en modificar poblaciones de mosquitos, para ello mediante CRISPR se quiere insertar un gen que haga que los mosquitos sean inmunes a *Plasmodium falciparum*, que es el parásito productor de la malaria, y no lo transmitan a humanos.

En el caso del cáncer se está tratando de hacer una **terapia basada en editar con CRISPR el ADN de las células de nuestro sistema inmune** para que reconozcan y ataquen a las células tumorales, y así el cáncer no se desarrolle. De hecho, en octubre de 2017 un equipo de investigación en China ha sido el primero en inyectar a una persona células editadas genéticamente por CRISPR-Cas9 para luchar contra el cáncer de pulmón ⁽¹⁸⁾.

POTENCIAL DE LA TECNOLOGÍAS CRISPR EN PLANTAS

Con el sistema CRISPR se están llevando a cabo modificaciones dirigidas en el genoma de especies de interés agronómico en las que las técnicas de manipulación o mejora genética convencionales eran costosas o incluso inviables.

Por lo tanto, el uso de CRISPR en agricultura se debería considerar como **un nuevo método de mejora** ya que se producen resultados idénticos a los que se producirían con los métodos convencionales, pero de forma más **predecible, rápida y barata**. La mayoría de los estudios se dirigen a ¿tejidos o cultivos? importantes para la agricultura, y los objetivos de las aplicaciones son mejorar caracteres como el rendimiento, la arquitectura de la planta y la tolerancia a enfermedades.

Tanto **CRISPR-Cas9** como **CRISPR-Cpf1** (sistema CRISPR procedente de la bacteria *Francisella tularensis*) son los dos sistemas mejor estudiados y más usados en plantas, pero se están investigando nuevas versiones de las nucleasas, porque casi la mitad de las bacterias y la mayoría de las arqueas tienen sistemas similares de CRISPR, y actualmente se están usando un pequeño número de sistemas cuando la variedad de **herramientas disponibles en la naturaleza es casi infinita**.

Algunos de los usos prometedores en agricultura se han mostrado en **cultivos de trigo, maíz y tomate**, desarrollando variedades mejoradas en caracteres como la defensa frente a plagas, la adaptación a la sequía, el rendimiento, y también la calidad y las características nutricionales para el consumidor ⁽¹⁹⁾. Algunos **ejemplos** de estos usos que se han llevado a cabo con éxito son el trigo sin gluten apto para celíacos al silenciar los genes que tenían la información para producir las α -, γ - y ω -gliadinas proteínas formadoras de gluten (figura 6).

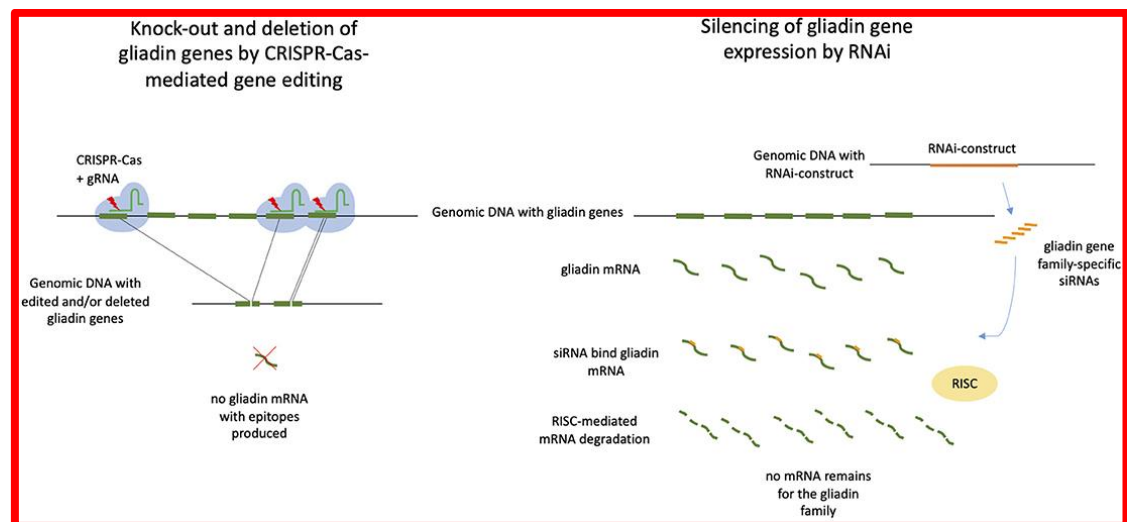


Figura 6. Edición y delección de genes mediada por CRISPR / Cas9 vs silenciamiento de genes de gliadina mediado por ARNi en trigo (20).

Izquierda: CRISPR / Cas9 con gRNA específicos de gliadina se dirigen a genes de gliadina, lo que resulta en la pérdida de fragmentos genómicos que contienen genes de gliadina completos y / o pequeñas delecciones internas.

Derecha: una construcción de ARNi dirigida a genes de gliadina que se ha insertado en el ADN del trigo produce pequeños ARN de interferencia (ARNip), que se unen al ARNm de gliadina.

Otros ejemplos de aplicaciones más concretos han sido llevados a cabo en arroz y soja. En el caso del **arroz**, CRISPR

ha sido usado por un equipo de Syngenta para crear delecciones en un gen llamado DEP1, teniendo como resultado panículas más densas y erectas, y plantas de menor altura, lo que conlleva un mayor rendimiento ⁽²¹⁾.

En **soja**, otro equipo de investigación ha conseguido plantas con un florecimiento tardío gracias a la inducción de mutaciones mediante CRISPR en un gen relacionado con el fotoperiodo de la floración, la variedad resultante tenía un tamaño vegetativo mayor con un mayor rendimiento ⁽²²⁾. Una aplicación similar a esta última se llevó a cabo en **tomate**, generando mutaciones en un gen responsable de la supresión de la floración llamado SP5G, consiguiendo un crecimiento más compacto de los tomates en campo, ya que la floración era más rápida, y además se conseguía un rendimiento temprano ⁽²³⁾.

En conclusión, la mejora convencional de plantas es poco probable que pueda hacer frente al futuro incremento de la demanda de alimento y a otros retos ambientales. Por el contrario, la tecnología CRISPR está eliminando las barreras de la edición genómica y va a revolucionar la mejora vegetal. Pero para conseguir aprovechar totalmente el potencial que nos ofrece la revolución CRISPR hay que centrarse en mejorar aún más la técnica y resolver la incertidumbre regulatoria

REFERENCIAS

- (1) Technology networks (genomics). (2019). Francis Mojica: The Modest Microbiologist Who Discovered and Named CRISPR
<https://www.technologynetworks.com/genomics/articles/francis-mojica-the-modest-microbiologist-who-discovered-and-named-crispr-325093>
- (2) Ishino, Y., Krupovic, M. y Forterre, P. (2018). History of CRISPR-Cas from Encounter with a Mysterious Repeated Sequence to Genome Editing Technology *Journal of Bacteriology* 200 (7).
- (3) Mojica, F. J., Diez-Villasenor, C., Garcia-Martinez, J., & Soria, E. (2005). Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *Journal of Molecular Evolution*, 60, 174–182.
- (4) Harvard University. (2015). CRISPR: A game-changing genetic engineering technique. <http://sitn.hms.harvard.edu/flash/2014/crispr-a-game-changing-genetic-engineering-technique/>.
- (5) Barrangou, R. and Marraffini, L. CRISPR-Cas Systems: Prokaryotes Upgrade to Adaptive Immunity (2014). *Molecular Cell* 54, 234-244.
- (6) Brouns, S.J., Jore, M.M., Lundgren, M., Westra, E.R., Slijkhuis, R.J., Snijders, A.P., Dickman, M.J., Makarova, K.S., Koonin, E.V., and van der Oost, J. (2008). Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. *Science* 321, 960–964.
- (7) Mali, P., Esvelt, K. M., & Church, G. M. (2013). Cas9 as a versatile tool for engineering biology. *Nature Methods*, 10(10), 957–963.
- (8) Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2012). A programmable dual- RNA- guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 337, 816–821.
- (9) Lander, N., Chiurillo, M. A., & Docampo, R. (2016). Genome Editing by CRISPR/Cas9: a Game Change in the Genetic Manipulation of Protists. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 63(5), 679–690.
- (10) European Parliament. (2020). What if CRISPR became a standard breeding technique?
[https://www.europarl.europa.eu/RegData/etudes/ATAG/2020/641535/EPRS_ATA\(2020\)641535_EN.pdf](https://www.europarl.europa.eu/RegData/etudes/ATAG/2020/641535/EPRS_ATA(2020)641535_EN.pdf)
- (11) Fundación Antama (2020). Científicos europeos advierten de que la legislación comunitaria sobre OMGs no se ajusta a la realidad. <https://fundacion-antama.org/cientificos-europeos-advierten-de-que-la-legislacion-comunitaria-sobre-omgs-no-se-ajusta-a-la-realidad/>
- (12) ALLEA (2020) lead authors: Dima, O.; Bocken H.; Custers, R.; Inze, D.; Puigdomenech, P.; Genome Editing for Crop Improvement. Symposium summary. Berlin. DOI: 10.26356/gen-editing-crop

- (13) Lamas-Toranzo I., Guerrero-Sánchez J., Miralles-Bover H., Alegre-Cid G., Pericuesta E., Bermejo-Álvarez P. (2017). CRISPR is knocking on barn door. *Reprod Dom Anim.*, 00:1–9.
- (14) Martínez-García, N., Barrionuevo-Melero, S., Marques, M., Bayón, Y. 'Aplicaciones Del Sistema CRISPR-Cas9 a La Modificación Genética En Animales Domésticos', *Ambiociencias*, 3021.17 (2020), 32.
- (15) Hsu, P. D., Lander, E. S., & Zhang, F. (2014). Development and Applications of CRISPR-Cas9 for Genome Engineering. *Cell*, 157(6), 1262–1278.
- (16) ISAAA (2018). Pocket K No. 54 Plant Breeding Innovation: CRISPR-Cas9. <http://www.isaaa.org/resources/publications/pocketk/54/default.asp>
- (17) Genetics Home Reference (2018). What are genome editing and CRISPR-Cas9. <https://ghr.nlm.nih.gov/primer/genomicresearch/genomeediting>
- (18) Cyranoski, D. (2018). CRISPR gene-editing tested in a person for the first time. https://www.nature.com/news/crispr-gene-editing-tested-in-a-person-for-the-first-time-1.20988?utm_source=MIT+TR+Newsletters&utm_campaign=bb7ed13a73-newsletters-the-download&utm_medium=email&utm_term=0_997ed6f472-bb7ed13a73-153724705&goal=0_997ed6f472-bb7ed13a73-153724705&mc_cid=bb7ed13a73&mc_eid=fed3b447a2
- (19) Gao C. (2018). The future of CRISPR technologies in agricultura. *Nature reviews. Molecular cell biology*, Jan 31, online.
- (20) Jouanin A, Gilissen LJWJ, Schaart JG, Leigh FJ, Cockram J, Wallington EJ, Boyd LA, van den Broeck HC, van der Meer IM, America AHP, Visser RGF and Smulders MJM (2020) *CRISPR/Cas9 Gene Editing of Gluten in Wheat to Reduce Gluten Content and Exposure—Reviewing Methods to Screen for Coeliac Safety*. *Front. Nutr.* 7:51.
- (21) Wang, Y., Geng, L., Yuan, M., Wei, J., Jin C., Li, M., Yu K., Zhang Y., Jin, H., Wang, E., Chai, Z., Fu, X., Li, X. (2017). Deletion of a target gene in Indica rice via CRISPR/Cas9. *Plant Cell Reports* 36 (8): 1333–1343.
- (22) Cai, Y., Chen, L., Liu, X., Guo, C., Sun, S., Wu, C., Jiang, B., Han, T. and Hou, W. (2017). CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis of *GmFT2a* delays flowering time in soya bean. *Plant Biotechnology Journal*.
- (23) Soyk, S., Müller, N.A., Park, S.J., Schmalenbach, I., Jiang, K., Hayama, R., Zhang, L., Van Eck, J., Jiménez-Gómez, J.M., and Lippman, Z.B. (2017). Variation in the flowering gene *SELF PRUNING 5G* promotes day-neutrality and early yield in tomato. *Nature Genetics*, 49 (1): 162–168.



WWW.FUNDACION-ANTAMA.ORG

[@fundacionantama](https://twitter.com/fundacionantama)

REDACCIÓN: Jorge Luis Blázquez del Álamo y Lucía del Pozo Jiménez

DISEÑO: Jorge Luis Blázquez del Álamo

NOVIEMBRE 2020