


# Aplicaciones clínicas de la herramienta CRISPR-Cas

## (Clinical Applications of the CRISPR-Cas Tool)


Christopher Vaglio-Cedeño<sup>1</sup>, Esteban José Rodríguez<sup>2</sup>, Fernando Morales<sup>3</sup>

### Afiliación Institucional:


<sup>1</sup>Universidad de Costa Rica, Instituto de Investigaciones en Salud (INISA), San José, Costa Rica, christopher.vagliochedeno@ucr.ac.cr

 0000-0002-0371-387X

<sup>2</sup>Universidad de Costa Rica, Instituto de Investigaciones en Salud (INISA), San José, Costa Rica, esteban.rodriguez\_r@ucr.ac.cr

 0000-0003-4628-139X

<sup>3</sup>Universidad de Costa Rica, Instituto de Investigaciones en Salud (INISA), San José, Costa Rica, fernando.moralesmontero@ucr.ac.cr

 0000-0002-6564-8671

### Abreviaturas:

CRISPR, Repeticiones palindrómicas cortas agrupadas regularmente espaciadas.

ECV, Enfermedad Cardiovascular HDR, Reparación dirigida por homología.

NHEJ: Unión de extremos no homólogos.

TALEN, Nucleasas efectoras tipo activador de la transcripción.

ZFN: Nucleasas de dedo de zinc.

**Fuentes de apoyo:** Universidad de Costa Rica.

**Conflicto de interés:** Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

✉ fernando.moralesmontero@ucr.ac.cr



Esta obra está bajo una licencia internacional: Creative Commons Atribución-NoComercial-CompartirIgual 4.0.

## Resumen

El desarrollo de tecnologías para la edición del genoma ha abierto la posibilidad de apuntar directamente y modificar secuencias genómicas en casi todo tipo de células eucariotas. La edición del genoma ha ampliado nuestra capacidad para dilucidar la contribución de la genética a las enfermedades al promover la creación de modelos celulares y animales más precisos de procesos patológicos y ha comenzado a mostrar su potencial en una variedad de campos, que van desde la investigación básica hasta la biotecnología aplicada y biomédica. Entre estas tecnologías, el uso de las repeticiones palindrómicas cortas agrupadas regularmente espaciadas ha acelerado, en gran medida, el progreso de la edición de genes desde el concepto hasta la práctica clínica, generando, además, interés debido, no solo a su precisión y eficiencia, sino también a la rapidez y a los costos necesarios para su implementación en comparación con otras tecnologías de edición genómica.

En esta revisión se presenta información recabada de publicaciones indexadas en la base de datos PubMed que se encontraron mediante el uso de palabras claves asociadas con la tecnología y que se filtraron para retener solo aquellas con evidencias de avances clínicamente relevantes y que permiten demostrar algunas de las aplicaciones que tiene esta tecnología en la investigación, pronóstico y tratamiento de enfermedades genéticas, cardiovasculares, virales, entre otras; esto con el objetivo de dar a conocer la situación actual de los avances en aplicaciones clínicas de la herramienta CRISPR-Cas y fomentar aún más la investigación en esta tecnología, la cual, tal como se evidencia a lo largo de esta revisión, posee una gran versatilidad y un amplio rango de aplicaciones, lo que ofrece una enorme oportunidad en el campo de la medicina genómica, pero que, a su vez, requiere un mayor fomento en su investigación para mejorar la tecnología y acercarla aún más a consolidar aplicaciones clínicas de uso seguro, confiable y consistente.

**Descriptor:** CRISPR-Cas, edición genética, terapia génica, ZFN, aplicaciones clínicas.

## Abstract

The development of genome editing technologies has opened up the possibility of directly targeting and modifying genomic sequences in almost all types of eukaryotic cells. Genome editing has expanded our ability to elucidate the contribution of genetics to disease by promoting the creation of more precise cellular and animal models of disease processes and has begun to show its potential in a variety of fields, ranging from basic research to applied and biomedical biotechnology. Among these technologies, the use of clustered regularly spaced short palindromic repeats have greatly accelerated the progress of gene editing from concept to clinical practice, further generating interest due not only to its precision and efficiency, but also to the speed and costs required for its implementation

compared to other genomic editing methods. This review presents information collected from indexed publications in the PubMed database that were found by using keywords associated with the technology and filtered to retain only those with evidence of clinically relevant advances that demonstrate some of the applications that this technology has in research, prognosis, and treatment of genetic, cardiovascular, and viral diseases, among others; this with the aim of show the current situation of advances in clinical applications of the CRISPR-Cas tool and further encourage research in this technology, which, as evidenced throughout this review, has a great versatility and a wide range of applications, which offers an enormous opportunity in the field of genomic medicine but which, in turn, requires greater support in its research to improve the technology and bring it even closer to consolidating clinical applications of safe, reliable and consistent use.

**Keywords:** CRISPR-Cas, gene editing, gene therapy, ZFN, clinical applications.

**Fecha de recibido:** 12, septiembre, 2022

**Fecha de aceptado:** 07, noviembre, 2023

Mucho de la comprensión de la base genética de enfermedades o patologías que afectan a los humanos ha sido posible gracias a los datos de secuenciación del ADN de individuos afectados por estas patologías.<sup>1</sup> Desde el año 1983, cuando se identificó el primer gen asociado con una enfermedad hereditaria en humanos,<sup>2</sup> ha habido un importante avance en mejorar las diferentes técnicas/tecnologías utilizadas en el laboratorio para la identificación de regiones génicas asociadas con estas enfermedades. Hoy en día se conocen más de 6650 genes humanos que están asociados con alguna enfermedad.<sup>3</sup> La mayoría de estos genes se han asociado con enfermedades genéticas causadas por alteraciones en un único gen (trastornos monogénicos), tales como la enfermedad de Huntington, la fibrosis quística, la talasemia, distrofia miotónica, la anemia falciforme, entre otras. Además de estas enfermedades monogénicas, también se han descrito patologías humanas complejas, causadas por la acción de varios genes (trastornos multigénicos) y factores ambientales, tales como el cáncer, la diabetes, esquizofrenia, entre otras. A este segundo grupo también se le conoce como enfermedades multifactoriales. Actualmente, la mayoría de estas enfermedades carecen de un tratamiento efectivo. Sin embargo, las nuevas estrategias de secuenciación de siguiente generación han permitido desarrollar y avanzar en metodologías genómicas, contribuyendo con un mejor conocimiento y entendimiento de las bases genético-moleculares de todas estas enfermedades, lo que se espera se traduzca en diagnósticos más exactos, mejor información pronóstica y, en última instancia, un tratamiento efectivo contra los padecimientos de los pacientes.

En este sentido, la medicina genómica, un área de investigación reciente que ha venido avanzando desde que se completó el proyecto del genoma humano, se enfoca en el estudio y la búsqueda de nuevas y mejores estrategias terapéuticas que permitan combatir este tipo de enfermedades.<sup>4</sup> Actualmente, la medicina genómica en la práctica clínica se encuentra orientada a la rectificación de una mutación genética específica (causante de una

enfermedad monogénica) mediante tecnologías de ingeniería genética, tal como la terapia génica.<sup>5</sup> En términos generales y de forma simple, se entiende por terapia génica como el uso de los ácidos nucleicos (ADN o ARN) para el tratamiento, cura o prevención de trastornos humanos. Dependiendo del tipo de enfermedad, esto se puede lograr mediante la administración de un gen terapéutico funcional como un sustituto de la contraparte endógena defectuosa o faltante, o reduciendo los niveles de un producto genético defectuoso.<sup>6</sup> Una estrategia de terapia génica que ha venido tomando fuerza en los últimos cinco años es la edición del genoma humano. Esta edición del genoma consiste en cambiar deliberadamente la secuencia del ácido desoxirribonucleico (ADN) de una célula u organismo vivo con el fin de cambiar su fenotipo.<sup>7</sup> Para realizar esta edición es imprescindible, entre otras cosas, el uso de nucleasas (enzimas que cortan las dos cadenas de ADN) y el aprovechamiento de los sistemas de reparación del ADN propios de las células.<sup>8</sup> La reparación puede realizarse por uno de dos mecanismos principales: 1- reparación homóloga dirigida (HDR) y reparación no-homóloga “end-joining” (NHEJ).<sup>9</sup> Esta revisión se concentrará en la estrategia conocida como “Repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas” (CRISPR por sus siglas en inglés) y sus aplicaciones en la salud humana.

El objetivo principal de esta publicación es presentar una revisión de la literatura sobre las aplicaciones clínicas de la herramienta CRISPR-Cas en el área de la salud, para fomentar la investigación en este campo en Costa Rica.

## Metodología

Esta revisión incluye los artículos disponibles en la base de datos Pubmed y que se encontraron al realizar búsquedas utilizando palabras clave relevantes, “CRISPR”, “Cas”, “edición genómica”, “terapia génica”, “aplicaciones

clínicas” y sus respectivas combinaciones. Se aplicaron criterios de inclusión y exclusión de la siguiente manera:

- Criterios de inclusión: Estudios que examinen la aplicación de CRISPR-Cas en seres humanos o modelos animales relevantes para la medicina humana; estudios clínicos que evalúen los efectos terapéuticos de CRISPR-Cas en enfermedades humanas, así como su seguridad y eficacia; estudios que utilicen técnicas de edición genética para corregir o eliminar mutaciones patogénicas o para mejorar la expresión de genes específicos; estudios publicados en revistas científicas revisadas por pares; estudios *in vitro* así como estudios *in vivo* y revisiones sistemáticas.
- Criterios de exclusión: Estudios que usaron la estrategia CRISPR-Cas pero con resultados poco robustos y estudios que sean duplicados o que se basen en datos ya incluidos en otros estudios revisados en la revisión sistemática.

### Inicio de la edición de genomas

Los primeros pasos hacia la ingeniería genética comenzaron a gestarse en la década de 1970 y a partir de ahí se estableció un nuevo horizonte del conocimiento.<sup>10</sup> Inicialmente se trabajó con métodos que se basaban en mecanismos de reparación de la ruptura de la doble hebra de ADN (double strand break, DSB), los cuales se llevaban a cabo usando meganucleasas. Sin embargo, este método resultó ser altamente inespecífico, difícil de establecer la secuencia de interés y muy costoso. Es a mediados de la década de los 80 cuando se descubren los primeros elementos importantes que participan en la edición del genoma. En 1985 se descubrieron

las proteínas de dedo de zinc, que presentan propiedades de unión sitio-específicas al ADN.<sup>11</sup> No obstante, no fue sino hasta el 2001 que se diseñó una nucleasa quimérica llamada nucleasa de dedo de zinc (ZFN), en la que los dominios de dedos de zinc eran los responsables de la identificación del ADN de interés,<sup>12</sup> cumpliendo con las dos características críticas que debía tener para realizar la edición del genoma: 1- reconocimiento de una secuencia específica en el genoma, y 2- actuar como una nucleasa de restricción, ósea, con la capacidad de cortar las cadenas de ADN.<sup>13</sup> Sin embargo, se requería de mucho tiempo para diseñarlas contra una región específica y se obtiene un número bajo de regiones blanco potenciales en el genoma.<sup>5</sup>

Esta limitación proporcionó las bases para la aparición de una nueva generación de nucleasas que podían apuntar a una región específica en el genoma. En el 2009, varios grupos de investigación descubrieron que los patógenos formadores de agallas contenían unas proteínas a las que se les dio el nombre de “efectores similares a los activadores de la transcripción” (TALE por sus siglas en inglés). Estas proteínas eran capaces de unirse específicamente a regiones blanco en los genomas de las plantas y causar enfermedades.<sup>14</sup> Posterior a esto, otros investigadores combinaron los TALE y las nucleasas *fokI*, creando un nuevo sistema de edición de genes denominado nucleasas efectoras similares a los activadores de la transcripción (TALEN) para una mejor selección génica.<sup>15</sup> Esta estrategia de edición presenta varias ventajas: 1- requiere de un diseño más simple; 2- puede escindir cualquier secuencia de ADN de interés con una frecuencia relativamente alta y 3- presenta un bajo número de sitios de corte no deseados<sup>16-19</sup> a pesar de esto, ambas tienen sus limitaciones (Cuadro 1).

<b>Cuadro 1. Comparación de los tres sistemas de edición más comúnmente utilizados para edición genética.</b> Editado de: González-Romero et al., 2019 <sup>20</sup>		
<b>Sistema</b>	<b>Ventajas</b>	<b>Desventajas</b>
ZFN	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Posibilidad de desarrollar nucleasas</li> <li>• Altamente eficiente</li> <li>• Permite reparación HDR o NHEJ</li> <li>• Permite ediciones bialélicas</li> <li>• Funciona en diferentes tipos celulares y especies</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Posibilidad de edición fuera de blanco, pero menor que en CRISPR.</li> <li>• Nucleasas más difíciles de diseñar.</li> </ul>
TALEN	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mas fáciles de diseñar que ZFN</li> <li>• Altamente eficiente</li> <li>• Permite reparación HDR o NHEJ</li> <li>• Permite ediciones bialélicas</li> <li>• Funciona en diferentes tipos celulares y especies</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Posibilidad de edición fuera de blanco, pero menor que en CRISPR.</li> <li>• Mas difícil de diseñar que CRISPR.</li> </ul>
CRISPR-Cas	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fácil diseño y optimización</li> <li>• Mayor eficiencia</li> <li>• Permite reparación HDR o NHEJ</li> <li>• Permite ediciones bialélicas</li> <li>• Funciona en diferentes tipos celulares y especies</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mayor posibilidad de edición fuera de blanco.</li> <li>• La secuencia PAM restringe la selección de posibles blancos.</li> </ul>

Mientras esto ocurría, a principios de 1987, se descubrieron las “repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas” (CRISPR), originalmente en el ADN de *E. coli* y posteriormente en muchas otras especies de bacterias.<sup>21</sup> La función de estas secuencias repetidas cortas permaneció incierta durante muchos años, hasta que experimentos posteriores revelaron que esas secuencias participaban en la defensa inmune adaptativa en bacterias y arqueas, atacando y cortando el ADN extraño, y que era guiado por el ARN.<sup>22-24</sup> Por otra parte, la proteína Cas es una enzima presente en bacterias que utiliza las secuencias CRISPR como guía para reconocer y escindir cadenas específicas de ADN que son complementarias a la secuencia CRISPR. Estas cadenas complementarias corresponden a los virus que infectan a las bacterias. De esta forma, las bacterias utilizan estas secuencias y a la proteína Cas como un sistema inmune contra el ataque de virus.<sup>25</sup>

Luego de la identificación de su función, un grupo de científicos llegó a la conclusión de que CRISPR podría utilizarse para la ruptura dirigida de la doble cadena del ADN, y posteriormente para la edición de genes en mamíferos, esto al programar una nucleasa (Cas9) a partir de repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas (CRISPR) simplemente cambiando su ARN guía,<sup>22</sup> lo cual representa un gran avance con respecto a la escisión de ADN guiada por proteínas utilizada por TALEN y ZFN.<sup>26</sup> Es por esto (y por otras razones, ver cuadro 1) que, en la actualidad, la estrategia de edición de genoma más utilizada es CRISPR-Cas9. De hecho, si se realiza una búsqueda en PubMed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov>) y se utilizan como palabras clave CRISPR-Cas9, el resultado es que hay más de 31 mil investigaciones en menos de 10 años, muchas más que las que aparecen si se usan TALEN y ZFN, incluso juntas.

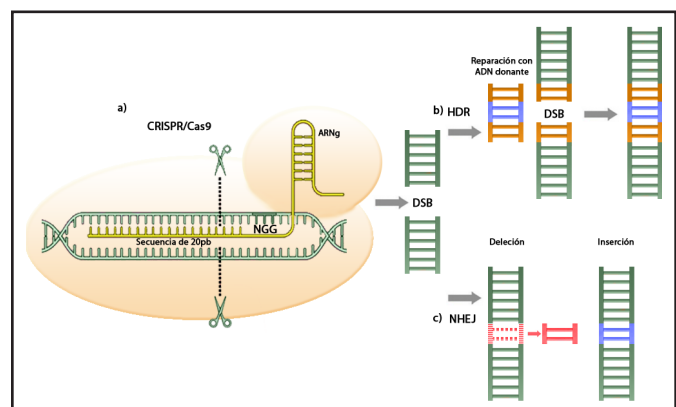
Las tecnologías de edición del genoma basadas en nucleasas sintéticas o bacterianas se han desarrollado a un ritmo muy rápido en los últimos cinco años y han comenzado a mostrar una extraordinaria utilidad en varios campos, que van desde la investigación básica a la biotecnología aplicada y a la investigación biomédica.<sup>27</sup> Esto ha permitido profundizar y comprender mejor la relación entre el producto de un único gen (usualmente asociado con una patología humana) y el fenotipo de los individuos afectados por una patología específica.<sup>28</sup> La edición del genoma se puede llevar a cabo *in vitro* o *in vivo* mediante la entrega de la maquinaria de edición *in situ*, la cual agrega, remueve o “corrige” los genes, así como también puede realizar otras modificaciones genómicas altamente dirigidas.<sup>29,30</sup>

### Mecanismo de CRISPR-Cas9

El término CRISPR corresponde a una serie de secuencias de ADN que se encuentran dentro de los

genomas de organismos procariotas, como bacterias y arqueas. Aunque se identificaron en *Escherichia coli*,<sup>21</sup> se ha reportado su presencia en más del 40 % de bacterias y del 90 % de arqueas.<sup>31</sup>

El sistema CRISPR-Cas se divide en dos clases, las cuales se basan en la variación estructural de los genes Cas y su estilo de organización.<sup>22</sup> La clase 1 consiste de complejos efectores multiproteicos, mientras que la clase 2 consiste de solo una proteína efectora. En total, se han reportado seis tipos de CRISPR-Cas y al menos 29 subtipos,<sup>32</sup> y la lista se expande rápidamente. El subtipo más frecuentemente usado es el sistema CRISPR-Cas9 tipo II, el cual depende de una sola proteína Cas de *Streptococcus pyogenes* (SpCas9). Esta proteína se dirige a las secuencias de ADN de interés, por lo que se convierte en una herramienta de edición de genomas atractiva.<sup>33</sup> Mecánicamente, el sistema CRISPR-Cas9 consta de dos componentes; 1- un ARN guía monocatenario (ARNg) y 2- una endonucleasa Cas9. El ARNg usualmente consta de una secuencia única de 20 pares de bases (pb) que está diseñada para unirse al sitio de ADN de interés de una manera específica de la secuencia. Una vez realizado el corte de la doble hebra de ADN, se desencadenan las vías de reparación del ADN celular, tal como la reparación homóloga dirigida (HDR),<sup>34</sup> y es por este medio que se pueden realizar modificaciones genómicas específicas, incluida la introducción de pequeñas inserciones y deleciones, o el cambio de un nucleótido por otro.<sup>35</sup> (Figura 1) Este tipo de edición del genoma se puede lograr *in vitro* o *in vivo* mediante la entrega de la maquinaria de edición *in situ*, que se encarga de eliminar, editar y realizar modificaciones genómicas altamente específicas.<sup>29,36</sup>



**Figura 1.** Mecanismo CRISPR/Cas9. a) complejo de edición con ARN guía monocatenario (ARNg) con secuencia de 20pb específica para unión al ADN de interés y una endonucleasa Cas9 b) Mecanismo de reparación homóloga dirigida (HDR) del ADN utiliza un ADN donante como plantilla para la reparación c) Mecanismo de reparación no homóloga “end-joining” (NHEJ) introduce pequeñas deleciones o inserciones en los sitios de ruptura de la doble hebra del ADN (DSB). Adaptado de: Feng et al., 2020<sup>37</sup>.

**Aplicaciones de la tecnología CRISPR-Cas9**

**CRISPR y cáncer**

En condiciones normales, las células se reproducen a medida que el cuerpo las necesita, sin embargo, cuando hay defectos en los sistemas que controlan o regular la división celular, estas inician un crecimiento descontrolado provocando los tumores. Los mecanismos celulares y moleculares que están detrás de esta enfermedad aun no son del todo claros, pero es bien conocido que mutaciones en los oncogenes y los genes supresores de tumores juegan un papel muy importante en el desa-

rollo del cáncer. Esas mutaciones representan un blanco para las estrategias de edición del genoma, donde el uso de CRISPR-Cas9 permitiría reemplazar las mutaciones malignas con secuencias de ADN normales.<sup>38</sup>

La tecnología CRISPR-Cas9 ha demostrado un beneficio terapéutico contra el cáncer al reparar genes supresores de tumores inactivados en células cancerígenas.<sup>39</sup> (Cuadro 2) Adicionalmente, este tipo de estrategia de reactivación ha permitido establecer con detalle los modelos de la progresión tumoral,<sup>40</sup> ayudando a comprender los mecanismos de actividad de tumoral.

**Cuadro 2. Casos y efectos reportados de edición genética con CRISPR-Cas en blancos de acción específicos**

Aplicación	Blanco de acción	Función normal	Estrategia de Edición Genética	Efecto obtenido	Ref.
Cáncer	<i>PTEN</i>	Gen que detiene crecimiento tumoral	Reactivación del gen mediante reparación	Inhibición de vías cancerígenas Restablece comportamiento celular normal	35 36
	<i>NRF2</i>	Gen que promueve quimioresistencia	Eliminación del gen	Aumenta sensibilidad al cisplatino Aumenta sensibilidad al carboplatino	38
	<i>SKA3</i>	Gen que promueve quimioresistencia	Eliminación del gen	Aumenta sensibilidad al cisplatino en células de cáncer de laringe	39
	<i>AURKB</i>	Gen que genera división celular en líneas de Cáncer Pulmonar	Eliminación del gen	Restauración del gen supresor de tumores <i>TP53</i> Aumenta sensibilidad al cisplatino y al paclitaxel	41
	<i>ERCC1</i>	Gen que promueve quimioresistencia	Eliminación del gen	Disminuye sensibilidad a cisplatino en líneas celulares de cáncer de pulmón	42
Cardiovascular	<i>MHCII</i>	Complejo proteico que presenta péptidos de antígenos exógenos a linfocitos T CD4+	Doble inactivación genética	Conservan capacidad de formar estructuras vasculares sin activar células T CD4+ alogénicas Relevante en injertos y trasplante de corazón	44
	<i>MYBCP3</i>	Gen importante para correcto desarrollo y función ventricular	Reparación de la delección en embriones	Corrección de la mutación Alta eficiencia y precisión de la corrección	46
Enfermedades hematopoyéticas	<i>HBB</i>	Gen que genera una subunidad formadora de hemoglobina	Trasplante de iPSCs y progenitoras hematopoyéticas corregidas con CRISPR-Cas9	Recuperación de función normal de hemoglobina y obtención de material apto para tratamiento de trasplante de células	57-61
Infecciones virales	SARS-CoV-2	Virus que genera el Síndrome Respiratorio agudo severo de coronavirus (COVID-19)	Escisión de molécula reportera en presencia de coronavirus	Tasa del 95% Confirmación de presencia del virus con 0% margen de error de falsos positivos	68
	Genoma VIH	Retrovirus con blanco a células T CD4+ Desarrolla el SIDA	Escisión de repeticiones terminales largas en VIH, así como inducción de mutación o eliminación de genes internos del VIH	Evidencias de eficiencia en tratamiento en modelos animales y capacidad de inducir inmunización intracelular a la infección por VIH	70-72
	Genoma VHB	Virus de ADN ataca células hepáticas. Causa infección crónica y cirrosis hepática	Inducción de mutaciones en regiones conservadas del ADN viral	Reducción de hasta 10 veces en niveles de ADNccc de VHB	77,80-82

Por otra parte, la resistencia de las células cancerosas a los fármacos quimioterapéuticos también ha sido un obstáculo importante para el tratamiento de esta enfermedad. El mecanismo principal de la quimiorresistencia es la desregulación de genes relacionados con este proceso.<sup>41</sup> Por lo tanto, la identificación de estos genes y la modulación de sus niveles de expresión o funciones, son clave para la eliminación de las células cancerosas quimiorresistentes. Experimentos que han involucrado la eliminación de genes mediados por CRISPR/Cas9 han identificado cuáles eliminaciones aumentan o disminuyen la sensibilidad a agentes como el cisplatino y al carboplatino.<sup>41-44</sup> (Cuadro 2) De esta forma se puede apreciar que el uso de la tecnología CRISPR/Cas9 permite identificar y validar genes quimiorresistentes relevantes en el tratamiento clínico del cáncer.<sup>39</sup> En un futuro se espera que la tecnología CRISPR-Cas9 ayude a establecer modelos de cáncer precisos, promoviendo significativamente la investigación genómica funcional del cáncer y facilitando el avance de las terapias contra el cáncer.

### **Enfermedad cardiovascular (ECV)**

Las ECVs se han transformado en un gran problema para la salud humana, pues se han convertido en la principal causa de muerte en muchos países industrializados. Se han identificado diferentes tipos de ECV, los cuales se asocian, generalmente, con una única mutación genética o una combinación de mutaciones hereditarias raras.<sup>45</sup> En general, la mayoría de los tratamientos clínicos se centran en el alivio de los síntomas de la enfermedad sin abordar posibles defectos genéticos. Actualmente, con la ayuda de las tecnologías de edición del genoma, se han creado varios modelos de investigación de enfermedades cardiovasculares que permiten aproximaciones muy prometedoras para aplicar la tecnología en el campo de la bioingeniería de aloinjertos, incluidos los trasplantes de corazón<sup>46</sup>, así como la implementación de la técnica en embriones humanos para la corrección genética de genes, cuya alteración está asociada al desarrollo de miocardiopatía hipertrófica<sup>47</sup>, caracterizada por presentar hipertrofia ventricular y relajación miocárdica anormal que conduce a arritmias e insuficiencia cardíaca diastólica.<sup>48</sup> (Cuadro 2).

### **CRISPR y su aplicación en enfermedades genéticas y neurodegenerativas**

En las últimas décadas se ha logrado identificar más fácilmente las mutaciones y variantes genéticas asociadas o responsables de enfermedades en humanos (enfermedades genéticas). Sin embargo, estas enfermedades permanecen sin un tratamiento efectivo, esto a pesar del gran conocimiento que se ha adquirido sobre estas enfermedades en múltiples investigaciones. Esto indica que se requiere el desarrollo de nuevas y mejores metodologías para perfeccionar las dianas terapéuticas. No obstante, a medida que los métodos de detección de

genes han progresado, se ha vuelto cada vez más claro que el gen que causa la enfermedad es el objetivo terapéutico ideal, incluso cuando no se comprenden completamente sus funciones biológicas. Los notables avances y el perfeccionamiento en la tecnología CRISPR-Cas9 (de aplicación protectora y terapéutica), la han convertido en una herramienta más eficiente y versátil.<sup>49</sup> Hasta la fecha, CRISPR-Cas9 ha sido ampliamente utilizada en enfermedades genéticas, incluyendo, la distrofia muscular de Duchenne,<sup>50</sup> la deficiencia de  $\alpha$ 1-antitripsina,<sup>51</sup> la hemofilia,<sup>52</sup> la pérdida de audición,<sup>53</sup> las enfermedades hematopoyéticas,<sup>54,55</sup> y en varias enfermedades neurodegenerativas (EN), tales como la enfermedad de Huntington (EH), Parkinson (EP), Alzheimer (EA), la distrofia miotónica (DM),<sup>56,57</sup> entre otras.

La  $\beta$ -talasemia y la enfermedad de células falciformes (ECF) (ejemplos de enfermedades hematopoyéticas) son enfermedades causadas por mutaciones puntuales heredadas o pequeñas deleciones del gen de la de la  $\beta$ -globina humana (*HBB*)<sup>55</sup> que generan que los portadores de las deleciones no produzcan suficiente  $\beta$ -hemoglobina funcional o que produzcan una hemoglobina anormal con un consecuente mal funcionamiento de los eritrocitos.<sup>58</sup> Estudios recientes muestran que la aplicación de terapia con trasplante de células madre y progenitoras hematopoyéticas, previamente corregidas con técnicas basadas en CRISPR-Cas9,<sup>59,60</sup> permiten la recuperación de la función normal de la hemoglobina, lo que generaría una rica fuente de células para trasplante<sup>61-63</sup>, sobre todo considerando que, en varios estudios, este tipo de correcciones se han realizado con éxito en células madre pluripotentes inducidas (iPSCs) derivadas de pacientes y sin dejar ninguna huella residual.<sup>64-65</sup> (Cuadro 2)

Con respecto a las enfermedades hereditarias neurodegenerativas (y otras enfermedades hereditarias), debido a que muchas de estas son causadas por mutaciones en genes únicos o se han descrito pocas variantes génicas asociadas con una enfermedad particular, la corrección de esa mutación en principio representaría la reversión funcional del gen dañado.<sup>56</sup> La tecnología de edición de genes CRISPR-Cas9 tiene la posibilidad de suprimir o reparar permanentemente las mutaciones que causan estas enfermedades, superando potencialmente las limitaciones de otras metodologías.<sup>66</sup> Las enfermedades neurodegenerativas tienen algunos rasgos en común, tales como la degeneración dependiente de la edad, son progresivas e incapacitantes, además de agregados proteicos en el núcleo/citoplasma en varios tipos de células del tejido nervioso. En estos momentos se está aplicando la tecnología CRISPR-Cas9 en modelos animales y celulares para realizar este tipo de corrección/edición en los genes dañados. El objetivo final de la aplicación de estas técnicas sería la de proporcionar tratamientos eficaces contra enfermedades genéticas humanas que antes se consideraban incurables.<sup>67</sup>

### **Detección de SARS-CoV-2**

En diciembre de 2019 inició un brote de la enfermedad conocida como síndrome respiratorio agudo severo de coronavirus (COVID-19) en Wuhan, China. La enfermedad es causada por la infección con el virus SARS-CoV-2, el cual se propagó rápidamente para producir una pandemia global, generando una necesidad de pruebas eficientes para la detección de la enfermedad.

Los procedimientos tradicionales y actuales que se usan para la detección del SARS-CoV2, como la PCR o la RT-qPCR necesitan un equipo grande y caro. Este análisis consume más tiempo y requiere más trabajo, además de aumentar la tasa de contaminación cuando se abre el tubo amplificado. Mediante el uso de CRISPR-Cas12, ha sido posible realizar la detección efectiva y eficiente de SARS-CoV-2 a partir de extractos de ARN recolectados usando un hisopado respiratorio, donde se detectan secuencias predefinidas de coronavirus por Cas12, esto lleva a cortar la molécula reportera, confirmando la detección del virus con una tasa del 95 % y con margen de error de falsos positivos de 0 %<sup>68</sup> (Cuadro 2).

#### **CRISPR y el tratamiento de infecciones virales**

Es bien conocido que el tratamiento efectivo de las infecciones virales es uno de los principales desafíos en el campo de la salud. A pesar del gran avance de los últimos años, todavía se está realizando una investigación exhaustiva para encontrar estrategias terapéuticas efectivas para el tratamiento de algunas infecciones virales, incluido el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) y algunos tipos de virus de la hepatitis. Después de identificar la eficacia de CRISPR-Cas9 en la edición de genes en células eucariotas, se ha visto que también podría usarse para tratar infecciones virales humanas. Al respecto, se han realizado estudios muy interesantes con progresos prometedores.<sup>69</sup>

#### **CRISPR-Cas9 y VIH**

El VIH pertenece a la familia de los retrovirus, el cual tiene a las células TCD4+ como blanco principal. Y desarrolla la enfermedad conocida como síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) que debilita significativamente el sistema inmune de la persona, volviéndola susceptible a infecciones y cánceres oportunistas que pueden generar su muerte.<sup>69</sup> El SIDA sigue siendo un desafío para la salud humana a pesar de los avances en el tratamiento/control y al uso actual de la terapia antirretroviral (HAART).<sup>70</sup> La infección por VIH comprende dos fases: 1- infección activa y 2- infección latente. Ambas fases ocurren al mismo tiempo un huésped infectado. En la fase activa, el virus se replica activamente e infecta a las células, provocando la aparición de síntomas. Por otra parte, en la fase latente, las nuevas partículas virales no se generan activamente, pero el genoma viral

permanece integrado en el ADN de la célula huésped, y cuando estas células experimentan reactivación, pueden producir nuevas partículas virales.<sup>71</sup> Debido a que la terapia antirretroviral no tiene ningún efecto sobre la infección latente,<sup>72</sup> esta fase se ha convertido en un reto para el tratamiento efectivo de esta enfermedad, sin embargo, se ha demostrado, en líneas celulares Jurkat, que la edición con CRISPR-Cas9 puede superar esta limitación al escindir el genoma viral, induciendo mutaciones o incluso la eliminación de genes del VIH integrados al genoma de la célula huésped.<sup>73</sup> Además, modelos animales *in vivo* han demostrado la capacidad del sistema CRISPR-Cas9 para ayudar en el tratamiento de la infección,<sup>74</sup> así como su capacidad para inducir inmunización intracelular<sup>75</sup> (Cuadro 2), aunque aún existen limitaciones para la aplicación eficaz del tratamiento, ya que el virus puede escapar al proceso de edición.

#### **CRISPR-Cas9 y virus de la hepatitis**

La hepatitis es una inflamación del hígado que puede llevar a estados crónicos como cirrosis o cáncer de hígado. La causa más importante de hepatitis son las infecciones virales causadas por los virus de la hepatitis B (VHB) y C (VHC).<sup>69</sup> El VHB es un virus de ADN que tiene un genoma pequeño.<sup>76</sup> Después de la entrada a los hepatocitos, el genoma del virus se libera y es transportado al núcleo, donde su ADN circular se convierte en ADN circular covalente cerrado (ADNccc), el cual puede integrarse en el genoma de la célula huésped.<sup>77</sup> En la actualidad, existen dos estrategias terapéuticas principales para el tratamiento de la infección por VHB, incluidos los inhibidores de la retrotranscripción (RT) y el interferón- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ). Aunque estos procedimientos han mostrado beneficios en el tratamiento de la infección por VHB, también han mostrado algunas limitaciones, como los efectos secundarios y la incapacidad de eliminar el ADNccc, causa principal de infección crónica y resistencia viral.<sup>78,79</sup>

Los estudios *in vitro* muestran que, al atacar regiones conservadas del genoma del VHB mediante la inducción de mutaciones en el ADNccc por CRISPR-Cas9, se puede reducir significativamente los niveles del ADNccc de VHB hasta ~ 10 veces,<sup>80-83</sup> (Cuadro 2) demostrando que el sistema CRISPR-Cas9 se puede aplicar al tratamiento del VHB, aumentando las esperanzas de un desempeño efectivo del método en humanos. Sin embargo, todavía quedan obstáculos por superar.<sup>69</sup>

#### **Desafíos y perspectivas futuras de la tecnología de edición de genomas**

Aunque el sistema CRISPR-Cas9 ha atraído una enorme atención por su potencial uso en el tratamiento de patologías humanas, quedan muchas variables a mejorar para aumentar su eficacia, especialmente si se va a utilizar

en terapia génica humana. Estos retos incluyen los efectos *off-target*, la eficiencia de edición, la aptitud de las células editadas, respuesta inmune y métodos de entrega.<sup>84,85</sup>

Primero, los efectos *off-target* refieren a que la tecnología CRISPR-Cas9 puede generar, con relativa frecuencia, modificaciones en ubicaciones genómicas no deseadas, lo que puede conducir potencialmente a mutaciones no deseadas y a toxicidad celular.<sup>86</sup> Así, se hace necesario realizar más investigación para disminuir la frecuencia de eventos *off-target* y mantener la especificidad de CRISPR-Cas9 en el futuro. El segundo reto es la eficiencia de la edición, ya que la eficiencia de la reparación de DSB mediada por NHEJ y HDR varía claramente en diferentes tipos y estados celulares, además de que pueden generar inserciones o deleciones en el sitio de corte. Las mejoras en la eficiencia de la edición con la reducción de los efectos *off-target* son esenciales para lograr una mejor eficacia terapéutica general.<sup>85</sup> El tercer reto consiste en la aptitud de las células editadas.<sup>3</sup> Si las células editadas poseen una mayor capacidad de proliferación o muestran una mayor adaptabilidad que las células no editadas, esto facilitará que el producto editado alcance el umbral terapéutico necesario para que el tratamiento tenga éxito. Por el contrario, si la eficiencia de la edición es baja o la adaptabilidad de las células editadas es escasa en comparación con las no editadas, el resultado terapéutico no sería el óptimo. El cuarto reto es la respuesta inmune provocada por la propia proteína Cas9. Esto se debe probablemente a la presencia de ciertos péptidos en Cas9 que pueden actuar como epítomos de unión al complejo mayor de histocompatibilidad (CMH). Es imperativo tener en cuenta que, al ser Cas9 una proteína de origen bacteriano, es de esperar que tenga efectos inmunogénicos inherentes en los mamíferos, y esto podría desestabilizar el sistema inmune del hospedero.<sup>85</sup> Por último, otro reto importante observado en estrategias de edición/tratamiento en cáncer, es la eficacia de la entrega de los componentes CRISPR-Cas9 específicos de la célula diana. En la actualidad, el portador más utilizado para entregar los componentes CRISPR-Cas9 son vectores virales, como el adenovirus (AAV).<sup>87</sup> A pesar de tener muchas ventajas, tales como bajo riesgo de carcinogénesis, la baja inmunogenicidad, así como la especificidad de la célula diana asociada al serotipo, todavía quedan aspectos por mejorar para aumentar la eficiencia de la entrega, como, por ejemplo, el tamaño del ADN insertado en el virus es limitado.<sup>88,89</sup>

No es objetivo de esta revisión ahondar en los temas éticos asociados con la tecnología; sin embargo, resulta relevante recordar que el sistema CRISPR/Cas9 para la edición de genes no está exento de este tipo de retos. Si bien es cierto, las aplicaciones clínicas en células somáticas adultas (donde la edición genética no se heredará a futuros hijos) son mayoritariamente aceptadas y vistas de forma favorable, también es cierto

que existen muchas preocupaciones sobre el uso de esta tecnología, con fines más allá de la investigación, a nivel de células germinales (donde la edición genética sí se podría heredar a las siguientes descendencias) y se temen casos, en contra de las posturas éticas, que conlleven nacimientos de niños “mejorados” con características genéticas editadas, tal como el caso comunicado por He Jiankui sobre el supuesto nacimiento de gemelas editadas para tener resistencia a la infección por VIH, caso que deja entrever la necesidad imperativa de que cualquier investigación y aplicación de esta tecnología sea regulada y rigurosamente vigilada con el fin de garantizar un correcto uso de la misma en aplicaciones clínicas relevantes y bajo fuertes estándares éticos.<sup>20</sup>

Como ya se ha comentado, para que el sistema de edición genética CRISPR sea eficiente, eficaz y pueda ser utilizado en la salud humana con la seguridad y rigurosidad requerida y necesaria, todavía debe responder y resolver diversos problemas u obstáculos, algunos mencionados anteriormente, no sin mencionar las preocupaciones éticas al respecto, que van en aumento gracias a los crecientes avances de esta tecnología y de las ciencias relacionadas. Pero a pesar de todas estas limitaciones, la tecnología asociada a CRISPR está transformando tanto la investigación como las áreas terapéuticas, esto al volverse la herramienta más versátil y poderosa de este siglo XXI, lo que se transformará en poco tiempo en un avance significativo del conocimiento científico.<sup>90</sup> CRISPR es relativamente aplicable y ha demostrado que puede corregir mutaciones que se asocian a diferentes enfermedades, como la talasemia y enfermedades neurodegenerativas; pero también ha proveído resultados prometedores en el tratamiento de enfermedades letales como el SIDA y el cáncer, indicando que la erradicación de diversas patologías humanas no está muy lejos de ocurrir a través del sistema CRISPR.

## Referencias

1. Risch N, Merikangas K. The future of genetic studies of complex human diseases. *Science*. 1996; 273:1516–7. DOI: [10.1126/science.273.5281.1516](https://doi.org/10.1126/science.273.5281.1516)
2. Gusella JF, Wexler NS, Conneally PM, Naylor SL, Anderson MA, Tanzi RE, et al. A polymorphic DNA marker genetically linked to Huntington's disease. *Nature*. 1983; 306:234–8. DOI: [10.1038/306234a0](https://doi.org/10.1038/306234a0)
3. Cox DBT, Platt RJ, Zhang F. Therapeutic genome editing: prospects and challenges. *Nat Med*. 2015; 21:121–31. DOI: [10.1038/nm.3793](https://doi.org/10.1038/nm.3793)
4. Roth SC. What is genomic medicine? *J Med Libr Assoc*. 2019; 107:3. DOI: [10.5195/jmla.2019.604](https://doi.org/10.5195/jmla.2019.604)
5. Maeder ML, Gersbach CA. Genome-editing technologies for gene and cell therapy. *Mol Ther*. 2016; 24:430–46. DOI: [10.1038/mt.2016.10](https://doi.org/10.1038/mt.2016.10)

6. Kaufmann KB, Büning H, Galy A, Schambach A, Grez M. Gene therapy on the move. *EMBO Mol Med.* 2013; 5:1642–61. DOI: [10.1002/emmm.201202287](https://doi.org/10.1002/emmm.201202287)
7. Gupta RM, Musunuru K. Expanding the genetic editing tool kit: ZFNs, TALENs, and CRISPR-Cas9. *J Clin Invest.* 2014; 124:4154–61. DOI: [10.1172/jci72992](https://doi.org/10.1172/jci72992)
8. Lee SH, Kim S, Hur JK. CRISPR and target-specific DNA endonucleases for efficient DNA knock-in in eukaryotic genomes. *Mol Cells.* 2018; 41:943–52. DOI: [10.14348/molcells.2018.0408](https://doi.org/10.14348/molcells.2018.0408)
9. O’Driscoll M, Jeggo PA. The role of double-strand break repair - insights from human genetics. *Nat Rev Genet.* 2006; 7:45–54. DOI: [10.1038/nrg1746](https://doi.org/10.1038/nrg1746)
10. Rothstein RJ. [12] One-step gene disruption in yeast. En: *Recombinant DNA Part C.* Elsevier; 1983. p. 202–11.
11. Diakun GP, Fairall L, Klug A. EXAFS study of the zinc-binding sites in the protein transcription factor IIIA. *Nature.* 1986; 324:698–9. DOI: [10.1038/324698a0](https://doi.org/10.1038/324698a0)
12. Bibikova M, Carroll D, Segal DJ, Trautman JK, Smith J, Kim Y-G, et al. Stimulation of homologous recombination through targeted cleavage by chimeric nucleases. *Mol Cell Biol.* 2001; 21:289–97. DOI: [10.1128/mcb.21.1.289-297.2001](https://doi.org/10.1128/mcb.21.1.289-297.2001)
13. Mojarrad M, Bozorg Qomi S, Asghari A. An overview of the crispr-based genomic- and epigenome-editing system: Function, applications, and challenges. *Adv Biomed Res.* 2019; 8:49. DOI: [10.4103/abr.abr\\_41\\_19](https://doi.org/10.4103/abr.abr_41_19)
14. Boch J, Scholze H, Schornack S, Landgraf A, Hahn S, Kay S, et al. Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science.* 2009; 326:1509–12. DOI: [10.1126/science.1178811](https://doi.org/10.1126/science.1178811)
15. Christian M, Cermak T, Doyle EL, Schmidt C, Zhang F, Hummel A, et al. Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. *Genetics.* 2010; 186:757–61. DOI: [10.1534/genetics.110.120717](https://doi.org/10.1534/genetics.110.120717)
16. Mussolino C, Morbitzer R, Lütge F, Dannemann N, Lahaye T, Cathomen T. A novel TALE nuclease scaffold enables high genome editing activity in combination with low toxicity. *Nucleic Acids Res.* 2011; 39:9283–93. DOI: [10.1093/nar/gkr597](https://doi.org/10.1093/nar/gkr597)
17. Holkers M, Maggio I, Liu J, Janssen JM, Miselli F, Mussolino C, et al. Differential integrity of TALE nuclease genes following adenoviral and lentiviral vector gene transfer into human cells. *Nucleic Acids Res.* 2013; 41:e63–e65. DOI: [10.1093/nar/gks1446](https://doi.org/10.1093/nar/gks1446)
18. Hockemeyer D, Wang H, Kiani S, Lai CS, Gao Q, Cassady JP, et al. Genetic engineering of human pluripotent cells using TALE nucleases. *Nat Biotechnol.* 2011; 29:731–4. DOI: [10.1038/nbt.1927](https://doi.org/10.1038/nbt.1927)
19. Ashmore-Harris C, Fruhwirth GO. The clinical potential of gene editing as a tool to engineer cell-based therapeutics. *Clin Transl Med.* 2020; 9:15. DOI: [10.1186/s40169-020-0268-z](https://doi.org/10.1186/s40169-020-0268-z)
20. González-Romero E, Martínez-Valiente C, García-Ruiz C, Vázquez-Manrique RP, Cervera J, Sanjuan-Pla A. CRISPR to fix bad blood: a new tool in basic and clinical hematology. *Haematologica.* 2019; 104:881–93. DOI: [10.3324/haematol.2018.211359](https://doi.org/10.3324/haematol.2018.211359)
21. Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M, Nakata A. Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J Bacteriol.* 1987; 169:5429–33. DOI: [10.1128/jb.169.12.5429-5433.1987](https://doi.org/10.1128/jb.169.12.5429-5433.1987)
22. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science.* 2012; 337:816–21. DOI: [10.1126/science.1225829](https://doi.org/10.1126/science.1225829)
23. Bolotin A, Quinquis B, Sorokin A, Ehrlich SD. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology.* 2005; 151:2551–61. DOI: [10.1099/mic.0.28048-0](https://doi.org/10.1099/mic.0.28048-0)
24. Pourcel C, Salvignol G, Vergnaud G. CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies. *Microbiology.* 2005; 151:655–63. DOI: [10.1099/mic.0.27437-0](https://doi.org/10.1099/mic.0.27437-0)
25. Barrangou R. The roles of CRISPR–Cas systems in adaptive immunity and beyond. *Curr Opin Immunol.* 2015; 32:36–41. DOI: [10.1016/j.coi.2014.12.008](https://doi.org/10.1016/j.coi.2014.12.008)
26. Jacinto FV, Link W, Ferreira BI. CRISPR/Cas9-mediated genome editing: From basic research to translational medicine. *J Cell Mol Med.* 2020; 24:3766–78. DOI: [10.1111/jcmm.14916](https://doi.org/10.1111/jcmm.14916)
27. Cornu TI, Mussolino C, Cathomen T. Refining strategies to translate genome editing to the clinic. *Nat Med.* 2017; 23:415–23. DOI: [10.1038/nm.4313](https://doi.org/10.1038/nm.4313)
28. Posey JE. Genome sequencing and implications for rare disorders. *Orphanet J Rare Dis.* 2019; 14:153. DOI: [10.1186/s13023-019-1127-0](https://doi.org/10.1186/s13023-019-1127-0)
29. Ghosh D, Venkataramani P, Nandi S, Bhattacharjee S. CRISPR–Cas9 a boon or bane: the bumpy road ahead to cancer therapeutics. *Cancer Cell Int.* 2019; 19(1). DOI: [10.1186/s12935-019-0726-0](https://doi.org/10.1186/s12935-019-0726-0)
30. Cherry JM, Hong EL, Amundsen C, Balakrishnan R, Binkley G, Chan ET, et al. *Saccharomyces Genome Database: the genomics resource of budding yeast.* *Nucleic Acids Res.* 2012; 40:D700–5. DOI: [10.1093/nar/gkr1029](https://doi.org/10.1093/nar/gkr1029)
31. Karginov FV, Hannon GJ. The CRISPR system: Small RNA-guided defense in bacteria and Archaea. *Mol Cell.* 2010; 37:7–19. DOI: [10.1016/j.molcel.2009.12.033](https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.12.033)
32. Makarova KS, Wolf YI, Alkhnbashi OS, Costa F, Shah SA, Saunders SJ, et al. An updated evolutionary classification of CRISPR–Cas systems. *Nat Rev Microbiol.* 2015; 13:722–36. DOI: [10.1038/nrmicro3569](https://doi.org/10.1038/nrmicro3569)
33. Jiang W, Bikard D, Cox D, Zhang F, Marraffini LA. RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR–Cas systems. *Nat Biotechnol.* 2013; 31:233–9. DOI: [10.1038/nbt.2508](https://doi.org/10.1038/nbt.2508)
34. Capecchi MR. Altering the genome by homologous recombination. *Science.* 1989; 244:1288–92. DOI: [10.1126/science.2660260](https://doi.org/10.1126/science.2660260)
35. Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F. Genome engineering using the CRISPR–Cas9 system. *Nat Protoc.* 2013; 8:2281–308. DOI: [10.1038/nprot.2013.143](https://doi.org/10.1038/nprot.2013.143)
36. Gaj T, Gersbach CA, Barbas CF III. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends Biotechnol.* 2013; 31:397–405. DOI: [10.1016/j.tibtech.2013.04.004](https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2013.04.004)
37. Feng S, Hu L, Zhang Q, Zhang F, Du J, Liang G, et al. CRISPR/Cas technology promotes the various application of *Dunaliella salina* system. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2020; 104:8621–30. DOI: [10.1007/s00253-020-10892-6](https://doi.org/10.1007/s00253-020-10892-6)
38. Zhan T, Rindtorff N, Betge J, Ebert MP, Boutros M. CRISPR/Cas9 for cancer research and therapy. *Semin Cancer Biol.* 2019; 55:106–19. DOI: [10.1016/j.semcancer.2018.04.001](https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2018.04.001)

39. Zhang H, Qin C, An C, Zheng X, Wen S, Chen W, et al. Application of the CRISPR/Cas9-based gene editing technique in basic research, diagnosis, and therapy of cancer. *Mol Cancer*. 2021; 20:1. DOI: [10.1186/s12943-021-01431-6](https://doi.org/10.1186/s12943-021-01431-6)
40. Heckl D, Kowalczyk MS, Yudovich D, Belizaire R, Puram RV, McConkey ME, et al. Generation of mouse models of myeloid malignancy with combinatorial genetic lesions using CRISPR-Cas9 genome editing. *Nat Biotechnol*. 2014; 32:941–6. DOI: [10.1038/nbt.2951](https://doi.org/10.1038/nbt.2951)
41. Maji S, Panda S, Samal SK, Shriwas O, Rath R, Pellicchia M, et al. Bcl-2 Antiapoptotic Family Proteins and Chemoresistance in Cancer. En: *Advances in Cancer Research*. Elsevier; 2018. p. 37–75.
42. Gao W, Zhang Y, Luo H, Niu M, Zheng X, Hu W, et al. Targeting SKA3 suppresses the proliferation and chemoresistance of laryngeal squamous cell carcinoma via impairing PLK1–AKT axis-mediated glycolysis. *Cell Death Dis*. 2020; 11:10. DOI: [10.1038/s41419-020-03104-6](https://doi.org/10.1038/s41419-020-03104-6)
43. Yu J, Zhou J, Xu F, Bai W, Zhang W. High expression of Aurora-B is correlated with poor prognosis and drug resistance in non-small cell lung cancer. *Int J Biol Markers*. 2018; 33:215–21. DOI: [10.1177/1724600817753098](https://doi.org/10.1177/1724600817753098)
44. Liu Y-P, Ling Y, Qi Q-F, Zhang Y-P, Zhang C-S, Zhu C-T, et al. The effects of ERCC1 expression levels on the chemosensitivity of gastric cancer cells to platinum agents and survival in gastric cancer patients treated with oxaliplatin-based adjuvant chemotherapy. *Oncol Lett*. 2013; 5:935–42. DOI: [10.3892/ol.2012.1096](https://doi.org/10.3892/ol.2012.1096)
45. Li AH, Morrison AC, Kovar C, Cupples LA, Brody JA, Polfus LM, et al. Analysis of loss-of-function variants and 20 risk factor phenotypes in 8,554 individuals identifies loci influencing chronic disease. *Nat Genet*. 2015; 47:640–2. DOI: [10.1038/ng.3270](https://doi.org/10.1038/ng.3270)
46. Abrahami P, Chang WG, Kluger MS, Qyang Y, Tellides G, Saltzman WM, et al. Efficient gene disruption in cultured primary human endothelial cells by CRISPR/Cas9. *Circ Res*. 2015; 117:121–8. DOI: [10.1161/CIRCRESAHA.117.306290](https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.306290)
47. Schlossarek S, Mearini G, Carrier L. Cardiac myosin-binding protein C in hypertrophic cardiomyopathy: Mechanisms and therapeutic opportunities. *J Mol Cell Cardiol*. 2011; 50:613–20. DOI: [10.1016/j.yjmcc.2011.01.014](https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2011.01.014)
48. Ma H, Marti-Gutierrez N, Park S-W, Wu J, Lee Y, Suzuki K, et al. Correction of a pathogenic gene mutation in human embryos. *Nature*. 2017; 548:413–9. DOI: [10.1038/nature23305](https://doi.org/10.1038/nature23305)
49. Sun J, Wang J, Zheng D, Hu X. Advances in therapeutic application of CRISPR-Cas9. *Brief Funct Genomics*. 2020; 19:164–74. DOI: [10.1093/bfgp/elz031](https://doi.org/10.1093/bfgp/elz031)
50. Min Y-L, Bassel-Duby R, Olson EN. CRISPR correction of duchenne muscular dystrophy. *Annu Rev Med*. 2019; 70:239–55. DOI: [10.1146/annurev-med-081117-010451](https://doi.org/10.1146/annurev-med-081117-010451)
51. Bjursell M, Porritt MJ, Ericson E, Taheri-Ghahfarokhi A, Clausen M, Magnusson L, et al. Therapeutic genome editing with CRISPR/Cas9 in a humanized mouse model ameliorates  $\alpha$ 1-antitrypsin deficiency phenotype. *E Bio Medicine*. 2018; 29:104–11. DOI: [10.1016/j.ebiom.2018.02.015](https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2018.02.015)
52. Wang D, Zhang G, Gu J, Shao X, Dai Y, Li J, et al. In vivo generated hematopoietic stem cells from genome edited induced pluripotent stem cells are functional in platelet-targeted gene therapy of murine hemophilia A. *Haematologica*. 2020; 105:e175–9. DOI: [10.3324/haematol.2019.219089](https://doi.org/10.3324/haematol.2019.219089)
53. György B, Nist-Lund C, Pan B, Asai Y, Karavitaki KD, Kleinstiver BP, et al. Allele-specific gene editing prevents deafness in a model of dominant progressive hearing loss. *Nat Med*. 2019; 25:1123–30. DOI: [10.1038/s41591-019-0500-9](https://doi.org/10.1038/s41591-019-0500-9)
54. Khosravi MA, Abbasalipour M, Concordet J-P, Berg JV, Zeinali S, Arashkia A, et al. Targeted deletion of BCL11A gene by CRISPR-Cas9 system for fetal hemoglobin reactivation: A promising approach for gene therapy of beta thalassemia disease. *Eur J Pharmacol*. 2019; 854:398–405. DOI: [10.1016/j.ejphar.2019.04.042](https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2019.04.042)
55. Antonarakis SE, Kazazian HH Jr, Orkin SH. DNA polymorphism and molecular pathology of the human globin gene clusters. *Hum Genet*. 1985; 69:1–14. DOI: [10.1007/bf00295521](https://doi.org/10.1007/bf00295521)
56. Li H, Yang Y, Hong W, Huang M, Wu M, Zhao X. Applications of genome editing technology in the targeted therapy of human diseases: mechanisms, advances and prospects. *Signal Transduct Target Ther*. 2020; 5. DOI: [10.1038/s41392-019-0089-y](https://doi.org/10.1038/s41392-019-0089-y)
57. Raaijmakers RHL, Ripken L, Ausems CRM, Wansink DG. CRISPR/Cas applications in myotonic dystrophy: Expanding opportunities. *Int J Mol Sci*. 2019; 20:3689. DOI: [10.3390/ijms20153689](https://doi.org/10.3390/ijms20153689)
58. Mahdih N, Rabbani B. Beta thalassemia in 31,734 cases with HBB gene mutations: Pathogenic and structural analysis of the common mutations; Iran as the crossroads of the Middle East. *Blood Rev*. 2016; 30:493–508. DOI: [10.1016/j.blre.2016.07.001](https://doi.org/10.1016/j.blre.2016.07.001)
59. Dever DP, Bak RO, Reinisch A, Camarena J, Washington G, Nicolas CE, et al. CRISPR/Cas9  $\beta$ -globin gene targeting in human haematopoietic stem cells. *Nature*. 2016; 539:384–9. DOI: [10.1038/nature20134](https://doi.org/10.1038/nature20134)
60. Hultquist JF, Schumann K, Woo JM, Manganaro L, McGregor MJ, Doudna J, et al. A Cas9 ribonucleoprotein platform for functional genetic studies of HIV-host interactions in primary human T cells. *Cell Rep*. 2016; 17:1438–52. DOI: [10.1016/j.celrep.2016.09.080](https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.09.080)
61. Rivella S, Rachmilewitz E. Future alternative therapies for  $\beta$ -thalassemia. *Expert Rev Hematol*. 2009; 2:685–97. DOI: [10.1586/ehm.09.56](https://doi.org/10.1586/ehm.09.56)
62. Isgrò A, Gaziev J, Sodani P, Lucarelli G. Progress in hematopoietic stem cell transplantation as allogeneic cellular gene therapy in thalassemia. *Ann N Y Acad Sci*. 2010; 1202:149–54. DOI: [10.1111/j.1749-6632.2010.05543.x](https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05543.x)
63. Hanna J, Wernig M, Markoulaki S, Sun C-W, Meissner A, Cassady JP, et al. Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin. *Science*. 2007; 318:1920–3. DOI: [10.1126/science.1152092](https://doi.org/10.1126/science.1152092)
64. Park SH, Lee CM, Dever DP, Davis TH, Camarena J, Srifa W, et al. Highly efficient editing of the  $\beta$ -globin gene in patient-derived hematopoietic stem and progenitor cells to treat sickle cell disease. *Nucleic Acids Res [Internet]*. 2019; 47:7955–72. DOI: [10.1093/nar/gkz475](https://doi.org/10.1093/nar/gkz475)
65. Song B, Fan Y, He W, Zhu D, Niu X, Wang D. Improved Hematopoietic Differentiation Efficiency of Gene-Corrected Beta-Thalassemia Induced Pluripotent Stem Cells by CRISPR/Cas9 System. *Stem Cells Dev*. 2015; 24:1053–65. DOI: [10.1089/scd.2014.0347](https://doi.org/10.1089/scd.2014.0347)
66. Lee JK, Jeong E, Lee J, Jung M, Shin E, Kim Y-H, et al. Directed evolution of CRISPR-Cas9 to increase its specificity. *Nat Commun*. 2018; 9. DOI: [10.1038/s41467-018-05477-x](https://doi.org/10.1038/s41467-018-05477-x)
67. Fan H-C, Chi C-S, Lee Y-J, Tsai J-D, Lin S-Z, Harn H-J. The role of gene editing in neurodegenerative diseases. *Cell Transplant*. 2018; 27:364–78. DOI: [10.1177/0963689717753378](https://doi.org/10.1177/0963689717753378)

68. Broughton JP, Deng X, Yu G, Fasching CL, Servellita V, Singh J, et al. CRISPR-Cas12-based detection of SARS-CoV-2. *Nat Biotechnol.* 2020; 38:870–4. DOI: [10.1038/s41587-020-0513-4](https://doi.org/10.1038/s41587-020-0513-4)
69. Mohammadzadeh I, Qujeq D, Yousefi T, Ferns GA, Maniati M, Vaghari-Tabari M. CRISPR/Cas9 gene editing: A new therapeutic approach in the treatment of infection and autoimmunity. *IUBMB Life.* 2020; 72:1603–21. DOI: [10.1002/iub.2296](https://doi.org/10.1002/iub.2296)
70. Sension MG. Long-term suppression of HIV infection: Benefits and limitations of current treatment options. *J Assoc Nurses AIDS Care.* 2007; 18:S2–10. DOI: [10.1016/j.jana.2006.11.012](https://doi.org/10.1016/j.jana.2006.11.012)
71. Ruelas DS, Greene WC. An integrated overview of HIV-1 latency. *Cell.* 2013; 155:519–29. DOI: [10.1016/j.cell.2013.09.044](https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.09.044)
72. Siliciano JD, Kajdas J, Finzi D, Quinn TC, Chadwick K, Margolick JB. Long-term follow-up studies confirm the stability of the latent reservoir for HIV-1 in resting CD4+ T cells. *Nat Med.* 2003; 9:727–8. DOI: [10.1038/nm880](https://doi.org/10.1038/nm880)
73. Ebina H, Misawa N, Kanemura Y, Koyanagi Y. Harnessing the CRISPR/Cas9 system to disrupt latent HIV-1 provirus. *Sci Rep.* 2013; 3. DOI: [10.1038/srep02510](https://doi.org/10.1038/srep02510)
74. Yin C, Zhang T, Qu X, Zhang Y, Putatunda R, Xiao X, et al. In vivo excision of HIV-1 provirus by saCas9 and multiplex single-guide RNAs in animal models. *Mol Ther.* 2017;25:1168–86. DOI: [10.1016/j.ymthe.2017.03.012](https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.03.012)
75. Liao H-K, Gu Y, Diaz A, Marlett J, Takahashi Y, Li M, et al. Use of the CRISPR/Cas9 system as an intracellular defense against HIV-1 infection in human cells. *Nat Commun.* 2015; 6:6413. DOI: [10.1038/ncomms7413](https://doi.org/10.1038/ncomms7413)
76. Venkatakrisnan B, Zlotnick A. The structural biology of hepatitis B virus: Form and function. *Annu Rev Virol.* 2016; 3:429–51. DOI: [10.1146/annurev-virology-110615-042238](https://doi.org/10.1146/annurev-virology-110615-042238)
77. Yuen M-F, Chen D-S, Dusheiko GM, Janssen HLA, Lau DTY, Locarnini SA, et al. Hepatitis B virus infection. *Nat Rev Dis Primers.* 2018; 4:18035. DOI: [10.1038/nrdp.2018.35](https://doi.org/10.1038/nrdp.2018.35)
78. Liang P, Xu Y, Zhang X, Ding C, Huang R, Zhang Z, et al. CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human tripronuclear zygotes. *Protein Cell.* 2015; 6:363–72. DOI: [10.1007/s13238-015-0153-](https://doi.org/10.1007/s13238-015-0153-)
79. Moyo B, Bloom K, Scott T, Ely A, Arbuthnot P. Advances with using CRISPR/Cas-mediated gene editing to treat infections with hepatitis B virus and hepatitis C virus. *Virus Res.* 2018; 244:311–20. DOI: [10.1016/j.virusres.2017.01.003](https://doi.org/10.1016/j.virusres.2017.01.003)
80. Kennedy EM, Bassit LC, Mueller H, Kornepati AVR, Bogerd HP, Nie T, et al. Suppression of hepatitis B virus DNA accumulation in chronically infected cells using a bacterial CRISPR/Cas RNA-guided DNA endonuclease. *Virology.* 2015; 476:196–205. DOI: [10.1016/j.virol.2014.12.001](https://doi.org/10.1016/j.virol.2014.12.001)
81. Ramanan V, Shlomai A, Cox DBT, Schwartz RE, Michailidis E, Bhatta A, et al. CRISPR/Cas9 cleavage of viral DNA efficiently suppresses hepatitis B virus. *Sci Rep.* 2015; 5. DOI: [10.1038/srep10833](https://doi.org/10.1038/srep10833)
82. Seeger C, Sohn JA. Targeting hepatitis B virus with CRISPR/Cas9. *Mol Ther Nucleic Acids.* 2014; 3. DOI: [10.1038/mtna.2014.68](https://doi.org/10.1038/mtna.2014.68)
83. Kostyushev D, Brezgin S, Kostyusheva A, Zarifyan D, Goptar I, Chulanov V. Orthologous CRISPR/Cas9 systems for specific and efficient degradation of covalently closed circular DNA of hepatitis B virus. *Cell Mol Life Sci.* 2019; 76:1779–94. DOI: [10.1007/s00018-019-03021-8](https://doi.org/10.1007/s00018-019-03021-8)
84. Lino CA, Harper JC, Carney JP, Timlin JA. Delivering CRISPR: a review of the challenges and approaches. *Drug Deliv.* 2018; 25:1234–57. DOI: [10.1080/10717544.2018.1474964](https://doi.org/10.1080/10717544.2018.1474964)
85. Cheng X, Fan S, Wen C, Du X. CRISPR/Cas9 for cancer treatment: technology, clinical applications and challenges. *Brief Funct Genomics.* 2020; 19:209–14. DOI: [10.1093/bfgp/ela001](https://doi.org/10.1093/bfgp/ela001)
86. Fu Y, Foden JA, Khayter C, Maeder ML, Reyon D, Joung JK, et al. High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nat Biotechnol.* 2013; 31:822–6. DOI: [10.1038/nbt.2623](https://doi.org/10.1038/nbt.2623)
87. Chen X, Gonçalves MAFV. Engineered viruses as genome editing devices. *Mol Ther.* 2016;24:447–457. DOI: [10.1038/mt.2015.164](https://doi.org/10.1038/mt.2015.164)
88. Kay MA. State-of-the-art gene-based therapies: the road ahead. *Nat Rev Genet [Internet].* 2011; 12:316–28. DOI: [10.1038/nrg2971](https://doi.org/10.1038/nrg2971)
89. Naso MF, Tomkowicz B, Perry WL III, Strohl WR. Adeno-associated virus (AAV) as a vector for gene therapy. *BioDrugs.* 2017; 31:317–34. DOI: [10.1007/s40259-017-0234-5](https://doi.org/10.1007/s40259-017-0234-5)
90. Tyagi S, Kumar R, Das A, Won SY, Shukla P. CRISPR-Cas9 system: A genome-editing tool with endless possibilities. *J Biotechnol.* 2020; 319:36–53. DOI: [10.1016/j.jbiotec.2020.05.008](https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2020.05.008)