

ARTÍCULO DE REVISIÓN

Tijeras Moleculares, el gran avance en la edición genética

Molecular scissors, the breakthrough in gene editing

Rolando Javier Álvarez-Pérez¹  , Robin Fajardo-Alcalá¹ , Ivanis Idael Corría-Milán² ¹Universidad de Ciencias Médicas de Granma. Facultad de Ciencias Médicas “Celia Sánchez Manduley”. Granma. Cuba²Universidad de Ciencias Médicas de Granma. Facultad de Ciencias Médicas de Bayamo. Granma. Cuba

Recibido: 11 de noviembre de 2023

Aceptado: 28 de julio de 2024

Publicado: 03 de septiembre de 2024

Citar como: Álvarez-Pérez RJ, Fajardo-Alcalá R, Corría-Milán II. Tijeras Moleculares, el gran avance en la edición genética. Universidad Médica Pinareña [Internet]. 2024 [citado: fecha de acceso]; 20(2024): e1022. Disponible en: <https://revgaleno.sld.cu/index.php/ump/article/view/1022>

RESUMEN

Introducción: Las CRISPR-Cas9 permite modificar, mutar, inhibir, promover, visualizar, corregir, insertar y cambiar el genoma en diferentes organismos, aunque existe información sobre el tema varias instituciones de salud y sus profesionales no conocen cómo se utilizan estas tecnologías.

Objetivo: describir el funcionamiento y aplicaciones de la CRISPR-Cas9.

MétodoS: se realizó una revisión bibliográfica de mayo a agosto del 2023. Se seleccionaron 27 referencias, la búsqueda se llevó a cabo en: Elsevier, SciELO, ClinicalKey, Pubmed y Google Académico.

Desarrollo: el sistema de edición génica CRISPR está orientado a seccionar el ADN cromosómico en posiciones específicas seleccionadas con anterioridad. A partir de este corte, es la célula quien emplea mecanismos de reparación del ADN. Tiene tres fases, en la primera hay un segmento del ácido nucleico ajeno que es incluido al locus; en la segunda, se produce la transcripción del complejo CRISPR/Cas y en la tercera se identifican las secuencias extrañas y las reducen. Se utiliza para esclarecer el mecanismo de los procesos biológicos en la enfermedad humana y su tratamiento; para tratar o prevenir enfermedades o discapacidades; transforma el genoma de células cuyas modificaciones pueden ser heredadas; induce modificaciones celulares para el mejoramiento humano.

Conclusiones: La CRISPR/Cas9 en su funcionamiento está compuesta por tres fases: fase de adaptación, fase de expresión y fase de interferencia. Permiten modificar bases específicas, inactivar genes, silenciando o activando información genética. Esas técnicas inciden sobre múltiples áreas, como la terapéutica de enfermedades y estudios biomédicos de base.

Palabras Clave: Bioética; Proteína 9 Asociada a CRISPR; Edición Genética; Ética Médica; Genes; Genoma Humano; Ingeniería Genética.

ABSTRACT

Introduction: CRISPR-Cas9 allows to modify, mutate, inhibit, promote, visualize, correct, insert and change the genome in different organisms, although there is information on the subject.

Although there is information on the subject, several health institutions and their professionals do not know how to use these technologies.

Objective: to describe the functioning and applications of CRISPR-Cas9.

Methods: a bibliographic review was carried out from May to August 2023. Twenty-seven references were selected, the search was carried out in: Elsevier, sciELO, ClinicalKey, Pubmed and Google Scholar.

Development: the CRISPR gene editing system is oriented to section chromosomal DNA at specific positions selected in advance. From this cut, it is the cell that employs DNA repair mechanisms. It has three phases: in the first, a segment of foreign nucleic acid is included in the locus; in the second, transcription of the CRISPR/Cas complex occurs; and in the third, the foreign sequences are identified and reduced. It is used to elucidate the mechanism of biological processes in human disease and its treatment; to treat or prevent diseases or disabilities; transforms the genome of cells whose modifications can be inherited; induces cellular modifications for human enhancement.

Conclusions: CRISPR/Cas9 in its operation is composed of three phases: adaptation phase, expression phase and interference phase. They allow modifying specific bases, inactivating genes, silencing or activating genetic information. These techniques affect multiple areas, such as disease therapeutics and basic biomedical studies.

Keywords: Bioethics; CRISPR-Associated Protein 9; Gene Editing; Ethics, Medical; Genes; Genome, Human; Genetic Engineering.

INTRODUCCIÓN

El descubrimiento más importante en los últimos 15 años en materia de ingeniería genética lo constituyen las Repeticiones Palindrómicas Cortas Agrupadas y Regularmente Interespaciadas CRISPR/Cas9, un sistema de manipulación genética de una aparición muy reciente, compuesto por las secuencias CRISPR y sus proteínas asociadas (Cas), ha tenido en la propia naturaleza su génesis como evidenció el microbiólogo español Francis Mojica en 1993, al descubrir que en las Arqueas y bacterias existía una repetición de secuencias en el ADN, estas secuencias estaban separadas por espaciadores que en posteriores estudios demostraron ser parte de secuencias homólogas de ADN vírico que anteriormente habían infectado la bacteria.^(1,2)

Este evento forma parte de un mecanismo inmunológico de defensa de estos microorganismos ante los bacteriófagos, existente desde hace millones de años y desconocido hasta entonces por la Ciencia.⁽²⁾ En el 2002 el Dr. Koonin evidenció que el CRISPR era el sistema inmune de las bacterias actuando como autovacunas. Contenido la información genética de aquellos virus que han infectado a las bacterias, funcionando como una memoria inmunológica, permitiendo reconocer si existe reinfección y protegerse ante esta al cortar el ADN viral.^(2,3)

Este sistema de defensa contra ADNs exógenos (virus y plásmidos), fue adaptado biotecnológicamente en el año 2012 para editar el genoma de cualquier organismo utilizando los conocimientos sobre la proteína CRISPR/Cas9. La relevancia de esta herramienta reside en su versatilidad, simplicidad y precisión. En los años anteriores al descubrimiento de las proteínas CRISPR, se realizaban grandes y complejas construcciones de 30 a 35 polipéptidos (Zinc fingers, TALENs),⁽⁴⁾ que se encargaban de identificar la secuencia de ADN a editar, estos polipéptidos estaban asociados a una enzima de restricción la cual seccionaba de manera inespecífica el ADN. CRISPR solo consta de dos elementos, una nucleasa y una guía de ARN.^(5,6)

La versatilidad de modificar el genoma ha sido puesta a prueba en diferentes organismos desde bacterias, levaduras, plantas, células de mamíferos, animales, embriones humanos y humanos adultos. Fuera de ser solamente tijeras moleculares, los sistemas CRISPR han evolucionado para mutar, inhibir, promover, visualizar, corregir, insertar y cambiar la forma en la que veíamos la herencia genética como el caso de CRISPR Gene-Drive.^(5,6) La información disponible en las bases de datos científicas acerca del tema va en aumento. A pesar de esto, varias instituciones de salud y sus profesionales no conocen cómo se utilizan estas tecnologías.⁽⁷⁾ La presente investigación se realizó con el **objetivo** de describir el funcionamiento y aplicaciones de la CRISPR-Cas9.

MÉTODOS

Se realizó una revisión bibliográfica de mayo a agosto del 2023. La búsqueda se llevó a cabo en las bases de datos: Elsevier, SciELO, ClinicalKey, y Pubmed, con el motor de búsqueda de Google Académico, se emplearon los términos: Edición Genética, CRISPR-Cas9, Tijeras Moleculares, Tijeras Genéticas, en idioma español e inglés. Se encontraron 79 artículos con disponibilidad de texto completo.

Las publicaciones encontradas se sometieron a los criterios de inclusión: pertinencia con la temática del estudio, que describieran el funcionamiento de las CRISPR-Cas9, publicadas entre los años 2019-2023; ser artículos de revisión, originales con disponibilidad de texto completo.

De los artículos seleccionados según el objetivo de la investigación, se evaluaron inicialmente títulos y resúmenes. Aquellos en los que el resumen no arrojó información suficiente para su selección se realizó la lectura del texto completo, quedando seleccionados 27 (34 %).

DESARROLLO

El funcionamiento del sistema CRISPR/Cas consta de 3 fases: fase de adaptación, fase de expresión y fase de interferencia. En la primera fase, o fase de adaptación, hay un segmento del ácido nucleico ajeno que es incluido al locus, específicamente a la región de espaciadores. Así, el proceso es integrado a la memoria para dar respuesta de manera efectiva ante infecciones futuras. En la incorporación actúan, degradando el ADN ajeno, las propias proteínas Cas, que identifican la secuencia diana en el ácido nucleico ajeno a través del apareamiento de bases complementarias de ADN de doble cadena o ARN monocatenario, y provoca la ruptura específica en la secuencia, evitando así la multiplicación y extensión de elementos genéticos ajenos.⁽⁸⁾

En la segunda fase, o fase de expresión, se produce la transcripción del complejo CRISPR/Cas. Este proceso conduce a un precursor, llamado CRISPR-ARN o pre-crARN, terminando en crARNs de pequeño tamaño que complementan la secuencia de ADN ajeno.⁽⁸⁾

Por último, la tercera fase o fase de interferencia, en la cual las proteínas Cas, utilizando como guía los crARNs resultantes de la fase de expresión, identifican las secuencias extrañas y las reducen, haciendo una ruptura específica que previene nuevas agresiones del agente intruso.⁽⁸⁾

Sistema de edición génica CRISPR

El sistema de edición génica CRISPR en su diseño más simple está orientado a seccionar el ADN cromosómico en una posición muy específica seleccionada con anterioridad. A partir de este corte, es la célula la que emplea múltiples mecanismos de reparación del corte del ADN.

El mecanismo de restauración de ADN más común es elevadamente mutagénico, ya que conlleva la delección de nucleótidos en la posición del corte, lo que acostumbra causar pérdida de la información genética, y si, además, se encuentra la secuencia diana dentro de la región codificante de un gen, el producto final acostumbra implicar su disrupción y pérdida funcional. Cambios del sistema pueden posibilitar que la restauración sea más conservativa, fomentando la recombinación genética y el intercambio de una secuencia específica del ADN por otra. Otras alteraciones del sistema CRISPR permiten modificar bases específicas, inactivar genes, silenciando o activando información genética, de forma que la gama de posibilidades de edición génica puede llegar a ser ilimitada.⁽⁹⁾

Esta tecnología de corta-y-pegar es muy eficaz, particularmente en la eficiencia y especificidad del corte, pero aún escapa del control el resultado final, ya que necesita del mecanismo de reparación seleccionado por la célula para "recoser" el corte realizado en la secuencia de ADN. En el caso de que apliquemos esta tecnología para editar el genoma de seres humanos, es esencial valorar que el proceso de "corta-y-pegar" tiene diferente resultado en cada secuencia de ADN (cada cromosoma), y el resultado común es la producción de individuos "mosaico", que tienen una combinación distinta de secuencias alélicas en cada célula. Además, se debe tener en cuenta la probabilidad de que la herramienta de edición génica no actúe siempre de forma absolutamente guiada, sino que pueda realizar cortes en regiones no previstas, los llamados lugares fuera del objetivo, produciendo efectos adversos no deseados.⁽⁹⁾

Se avanza hacia la comprensión de los distintos subtipos del sistema CRISPR/Cas y la utilización de complejos efectores más reducidos.^(10,11,12) Por otra parte, la entrega de los componentes de CRISPR/Cas es aún un reto. En el caso preciso de los vectores virales, preferidos a causa de su poca inmunogenicidad, el gran tamaño de los efectores Cas entorpece su empaquetamiento en el interior del vector.⁽¹³⁾ Existe mucho interés en crear estrategias de entrega no virales para insertar los componentes del sistema CRISPR/Cas en las células *in vivo*. Se ha experimentado con compuestos de nanopartículas lipídicas sólidas, lipofectamina, nanopartículas de oro y polímeros catiónicos como transportes de entrega no viral de Cas9, y el sgRNA ha hecho posible inactivar genes de manera efectiva *in vivo* en diversos tejidos.⁽¹⁴⁾

Las nanopartículas posibilitan tratamientos acumulativos recurrentes, por lo que, con un porcentaje mínimo de genes editados en cada tratamiento, el efecto positivo total puede aumentar con el número de aplicaciones. Aunque esto pueda parecer prometedor, los vehículos de entrega de CRISPR/Cas9 a través de nanopartículas necesitan ser mejorados en cuanto a la biodegradabilidad y la accesibilidad desde la corriente sanguínea hasta el tejido diana.⁽¹⁵⁾ Se han evidenciado avances relevantes en los últimos años para disminuir los defectos relacionados con los abordajes de entrega por virus, basados en mRNA, plásmidos y proteínas para el sistema CRISPR/Cas9. No obstante, cada plataforma aún afronta diversos obstáculos en la traducción. Sin embargo, los progresos actuales han conducido al desarrollo de transportes de entrega con capacidades sin precedentes sobrepasando muchas barreras que alguna vez estuvieron escondidas en la capacidad traduccional de este sistema.⁽¹⁴⁾

Esas técnicas inciden sobre múltiples áreas, como la terapéutica de enfermedades y estudios biomédicos de base. También podrían utilizarse para personalizar características humanas para fines extraterapéuticos de mejora. Entre las bondades de la edición para el tratamiento de enfermedades está el mejoramiento de terapias genéticas y celulares.⁽¹⁶⁾

A parte de las aplicaciones clínicas, la edición genética permite generar series de células isogénicas y animales alterados para su uso en estudios biomédicos de base. Las células isogénicas tienen un perfil genético concreto y estandarizado, mientras que los animales alterados (conocidos como "quimeras") poseen características del organismo humano. De esa manera, los científicos poseen en sus manos modelos experimentales de control que proporciona la generalización del conocimiento empírico.⁽¹⁶⁾ Actualmente, el manejo de estas herramientas de ingeniería genética se evidencia en cuatro contextos que necesitan consideraciones ético-regulatorias diferenciadas: la investigación básica, la aplicación clínica en células somáticas, la aplicación clínica en células germinales y el mejoramiento humano.⁽¹⁷⁾

Investigación básica: utilización de la edición genómica para arrojar luz sobre el mecanismo de los procesos biológicos en la enfermedad humana y su tratamiento. Existen provisiones éticas y regulatorias impuestas para velar por el correcto manejo de la edición genómica humana a través de modelos *in vitro* en laboratorio (v. g.: registro de protocolos de investigación, evaluación y aprobación por comités *ad hoc* sobre el proceso de investigación, vigilancia de resultados, presentación de datos ante pares, publicación de reportes finales, etcétera).⁽¹⁷⁾

Aplicación clínica en células somáticas: utilización de la edición genómica con el objetivo de tratar o prevenir enfermedades o discapacidad (v. g.: “corregir” células de diferentes tejidos humanos, excepto las células germinales). Además de las provisiones mencionadas en el punto anterior, el uso en células somáticas debe hacerse en el contexto de ensayos clínicos restringidos al tratamiento y la prevención de enfermedad o discapacidad, con evaluación sistemática de la seguridad y la eficacia, en un contexto de valoración de los riesgos/beneficios previstos y dentro de un marco de transparencia.⁽¹⁷⁾

Aplicación clínica en células germinales: este uso crea mayor inquietud debido a que transforma el genoma de células cuyas modificaciones pueden ser heredadas, en otras palabras, que provoca cambios integrados al genoma humano y su distribución en la población sin saber los efectos que puedan acarrear. Demanda mayor precaución en cuanto a seguridad y efectos no esperados, ya que puede incidir importantemente en los seres humanos desde un punto de vista individual, pero también como especie. Desde el punto de vista bioético, la alteración genómica de células germinales puede afectar principios como el de autonomía (en la medida en que los herederos de la modificación no deciden sobre dicha inclusión en su genoma), de beneficencia/no-maleficencia (la valoración del potencial riesgo/beneficio que representa) y, finalmente, la justicia (distribución inequitativa de los beneficios, riesgos y daños de la población, afectando o beneficiando a partes de la sociedad inequitativamente). Es por ello que el consenso internacional propone su uso solamente en situaciones cuyo objetivo solo sea el tratamiento o prevención de enfermedad o discapacidad sería (sobre todo en condiciones en las que se desconozca otra alternativa), bajo vigilancia estricta y siguiendo criterios muy específicos.⁽¹⁷⁾

Mejoramiento humano: se refiere al uso de las técnicas de edición genética para inducir modificaciones celulares en contextos donde no exista enfermedad y las capacidades funcionales de la persona son normales, a través del “mejoramiento humano” (por ejemplo, aumento de la masa muscular para tener más fuerza, aumento de las capacidades cognitivas, cambios estéticos). La utilización de estas técnicas fuera de situaciones en las que el tratamiento de enfermedades o discapacidades es considerado inapropiado actualmente, mientras se desconozcan los riesgos y efectos secundarios posibles y no se pueda determinar la incidencia sobre los principios de autonomía, beneficencia/no-maleficencia y justicia.⁽¹⁷⁾

Debido a su amplio rango de alcance, tanto en estudios de investigación como en el desarrollo de nuevos productos en diversos sectores como la industria agro-ganadera y la salud humana, se generó una atención especial a nivel global sobre las implicaciones medioambientales,⁽¹⁸⁾ políticas, económicas,⁽¹⁹⁾ y sociales.^(20,21,22,23) Aun siendo de gran importancia saber cómo funciona y sus múltiples aplicaciones, no debe dejarse de lado uno de los elementos que define su viabilidad: la regulación tecnológica.^(24,25,26)

Para seguir estimulando la biotecnología mediante los estudios investigación básica y el progreso de nuevas tecnologías, es menester concretar y diferenciar las técnicas de edición genética de otras, como la transgénesis, dentro del entorno regulatorio. Así se evitarían inconvenientes innecesarios dentro del entorno regulatorio-legal para solventar problemas actuales o fomentar soluciones más eficaces, sin abandonar la ética en la investigación y la bioseguridad que implica una tecnología de alto impacto.⁽²⁷⁾

CRISPR-Cas9 es una tecnología de edición genética que ha revolucionado la biología molecular desde su desarrollo. Su capacidad para realizar modificaciones precisas en el ADN ha abierto nuevas posibilidades en diversas áreas, incluyendo la medicina, la agricultura y la investigación básica.

La CRISPR-Cas9 se está utilizando para tratar enfermedades genéticas. Por ejemplo, ensayos clínicos han demostrado su eficacia en el tratamiento de la beta-talasemia y la anemia falciforme. En 2020, un estudio publicado en *Nature* mostró que pacientes tratados con CRISPR-Cas9 mostraron mejoras significativas en sus condiciones. Investigaciones están explorando el uso de CRISPR para desarrollar terapias contra el cáncer. Un estudio publicado en *Cell* demostró que se puede utilizar para eliminar células tumorales específicas sin afectar las células sanas circundantes. También se investiga como una herramienta para combatir infecciones virales, incluyendo el VIH y el SARS-CoV-2. Un estudio reciente mostró que CRISPR puede ser utilizado para desactivar genes virales, lo que podría ofrecer nuevas estrategias terapéuticas.

A pesar de sus beneficios, el uso de CRISPR-Cas9 plantea importantes cuestiones éticas. La posibilidad de editar genes en embriones humanos genera preocupaciones sobre "diseño genético" y sus implicaciones sociales. Existe preocupación sobre cómo estas tecnologías podrían exacerbar las desigualdades existentes en salud y acceso a alimentos. Las regulaciones varían globalmente; algunos países han adoptado enfoques más permisivos hacia la investigación con CRISPR, mientras que otros son más restrictivos.

CRISPR-Cas9 es una herramienta poderosa con aplicaciones potenciales que podrían transformar la medicina y la agricultura. Sin embargo, es crucial abordar los desafíos éticos y regulatorios asociados con su uso para garantizar que se utilice de manera responsable y equitativa.

CONCLUSIONES

La CRISPR/Cas9 está compuesta por las secuencias CRISPR y sus proteínas asociadas (Cas). Consta con tres fases: fase de adaptación, fase de expresión y fase de interferencia. Permiten modificar bases específicas, inactivar genes, silenciando o activando información genética. Esas técnicas inciden sobre múltiples áreas, como la terapéutica de enfermedades y estudios biomédicos de base.

Contribución de Autoría

RJAP: conceptualización, administración del proyecto, diseño de la metodología, redacción-borrador original, investigación.

RFA: administración del proyecto, diseño de la metodología, redacción-borrador original, investigación.

IICM: análisis formal, investigación, redacción-revisión y edición.

Declaración de conflicto de intereses

los autores no declaran tener conflicto de intereses.

Declaración de financiación los autores no recibieron financiación para el desarrollo del presente artículo.

Declaración de originalidad

Este manuscrito no ha sido publicado total o parcialmente, ni está siendo evaluado por otra revista

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Payán Ellacuria E. "Una revisión crítica del estado del arte de CRISPR-Cas9 ante las adversidades: una herramienta multidisciplinar de plena vigencia." *IUS ET SCIENTIA*[Internet]. 2018 [citado 20/07/2023]; 4(1): 132-145. Disponible en: <https://revistascientificas.us.es/index.php/ies/article/view/13291/11451>
2. Lucas Toca S. "La revolución del CRISPR." *REDS*[Internet]. 2019 [citado 20/07/2023]; 14(2019): 65-68. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=7219562>

3. Nieto, Carolina Rivera. "Edición genética: con grandes avances científicos vienen grandes responsabilidades." *Rev Salud Bosque*[Internet]. 2021 [citado 20/07/2023]; 11(1). Disponible en: <https://doi.org/10.18270/rsb.v11i1.3691>
4. Demirci, Y., Zhang, B. y Unver, T. 2018. CRISPR/Cas9: An RNA-guided highly precise synthetic tool for plant genome editing. *J Cell Physiol*[Internet]. 2018 [citado: 20/07/2023]; 233(3): 1844-1859. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28430356/>
5. Guzmán Zapata, D. "Avances de CRISPR en la producción vegetal." 10 FERIA DE TECNOLOGÍA[Internet]; 2023 [citado: 20/07/2023]. Disponible en: <https://www.colmayor.edu.co/wp-content/uploads/2021/12/4.5.-Avances-de-CRISPR-en-la-produccion-de-vegetal.pdf>
6. Herrera-Cabrera, Braulio Edgar, et al. "Edición genómica con CRISPR/Cas9: Premio Nobel de Química 2020." *Rev Química*[Internet]. 2021 [citado: 20/07/2023]; 35(1): 22-30. Disponible en: <https://revistas.pucp.edu.pe/index.php/quimica/article/view/23324>
7. Fajardo Alcalá R, Álvarez PérezRJ, Corría MilánII, Alcalá Brocard Z, Licea Rodríguez MA. ¿Cuánto se sabe sobre Edición Genética en la carrera de Medicina?. *RevDOSDIC* [Internet]. 2023 [citado: 20/07/2023]; 6(2): [aprox. 7 p.]. Disponible en: <https://revdosdic.sld.cu/index.php/revdosdic/article/view/444>
8. Sánchez Puerto D. SISTEMA CRISPR/CAS9 Y SU APLICACIÓN A LA EDICIÓN DIRIGIDA DE GENOMAS. [Internet]. [JAÉN]: Jaén: Universidad de Jaén; 2020 [citado 31/08/2023]. Disponible en: <http://crea.ujaen.es/jspui/handle/10953.1/12308>
9. Marfany G. Interrogantes y retos actuales de la edición genética. *Rev Bioética y Derecho* [Internet]. 2019 [citado 31/08/2023]; (47): 17-31. Disponible en: https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1886-58872019000300003
10. Pallarès Masmitjà M, Knödseder N, Güell M. CRISPR-gRNA Design[Internet]; 2019 [citado: 20/07/2023]. p. 3-11. Disponible en: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-9170-9_1
11. Fu BXH, Smith JD, Fuchs RT, Mabuchi M, Curcuru J, Robb GB, et al. Target-dependent nickase activities of the CRISPR-Cas nucleases Cpf1 and Cas9. *Nat Microbiol* [Internet]. 2019 [citado: 20/07/2023]; 4(5): 888-97. Disponible en: <http://www.nature.com/articles/s41564-019-0382-0>
12. Chow RD, Wang G, Ye L, Codina A, Kim HR, Shen L, et al. *In vivo* profiling of metastatic double knockouts through CRISPR-Cpf1 screens. *Nat Methods* [Internet]. may 2019 [citado: 20/07/2023]; 16(5): 405-8. Disponible en: <http://www.nature.com/articles/s41592-019-0371-5>
13. Adli M. The CRISPR tool kit for genome editing and beyond. *Nat Commun*[Internet]. 2018 [citado: 20/07/2023]; 9(1): 1911. Disponible en <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29765029/>
14. Luther DC, Lee YW, Nagaraj H, Scaletti F, Rotello VM. Delivery approaches for CRISPR/Cas9 therapeutics *in vivo*: advances and challenges. *Expert Opin Drug Deliv* [Internet]. 2018 [citado: 20/07/2023]; 15(9): 905-13. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30169977/>
15. Conboy I, Murthy N, Etienne J, Robinson Z. Making gene editing a therapeutic reality. *F1000Research* [Internet]. dic 2018 [citado: 20/07/2023]; 7: 1970. Disponible en: <https://f1000research.com/articles/7-1970>
16. Furtado, Rafael Nogueira. "Edición génica: riesgos y beneficios de la modificación del ADN humano." *Rev Bioét*[Internet]. 2019 [citado: 20/07/2023]; 27 (2): 223-233. Disponible en <https://www.scielo.br/j/bioet/a/jFptVvKR7RJHWXwmsKpZFrh/?lang=es>

17. Santillán-Doherty, Patricio, et al. "Reflexiones sobre la ingeniería genética: a propósito del nacimiento de gemelas sometidas a edición génica." *Gaceta méd Méx*[Internet]. 2020 [citado: 20/07/2023]; 156(1): 53-59. Disponible en https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0016-38132020000100053
18. Pineda M, Lear A, Collins JP, Kiani S. Safe CRISPR: Challenges and Possible Solutions. *Trends Biotechnol* [Internet]. abril 2019 [citado: 20/07/2023]; 37(4): 389-401. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.09.010>
19. Bartkowski B, Theesfeld I, Pirscher F, Timaeus J. Snipping around for food: economic, ethical and policy implications of CRISPR/Cas genome editing. *Geoforum* [Internet]. nov 2018 [citado: 20/07/2023]; 96: 172-80. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.geoforum.2018.07.017>
20. Dayan F. CRISPR Cas-9 genome editing and Islam: a religious perspective. *Bangladesh J Med Sci* [Internet]. dic 2018 [citado: 20/07/2023]; 18(1): 7-13. Disponible en: <https://dx.doi.org/10.3329/bjms.v18i1.39540>
21. Brokowski C. Do CRISPR Germline Ethics Statements Cut It? *Cris J* [Internet]. 2018 [citado: 20/07/2023]; 1(2): 115-25. Disponible en: <http://www.liebertpub.com/doi/10.1089/crispr.2017.0024>
22. Shew AM, Nalley LL, Snell HA, Nayga RM, Dixon BL. CRISPR versus GMOs: Public acceptance and valuation. *Glob Food Sec* [Internet]. dic 2018 [citado: 20/07/2023]; 19: 71-80. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211912418300877>
23. Isa NM, Zulkifli NA, Man S. Islamic Perspectives on CRISPR/Cas9-Mediated Human Germline Gene Editing: A Preliminary Discussion. *Sci Eng Ethics* [Internet]. 2019 [citado: 20/07/2023]; 26: 309-323. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s11948-019-00098-z>
24. Eş I, Gavahian M, Marti-Quijal FJ, Lorenzo JM, Mousavi Khaneghah A, Tsatsanis C, et al. The application of the CRISPR-Cas9 genome editing machinery in food and agricultural science: Current status, future perspectives, and associated challenges. *Biotechnol Adv* [Internet]. may 2019 [citado: 20/07/2023]; 37(3): 410-21. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.02.006>
25. Cathomen T, Schüle S, Schübler-Lenz M, Abou-El-Enein M. The Human Genome Editing Race: Loosening Regulatory Standards for Commercial Advantage? *Trends Biotechnol* [Internet]. feb 2019 [citado: 20/07/2023]; 37(2): 120-3. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.06.005>
26. Eriksson D, Kershen D, Nepomuceno A, Pogson BJ, Prieto H, Purnhagen K, et al. A comparison of the EU regulatory approach to directed mutagenesis with that of other jurisdictions, consequences for international trade and potential steps forward. *New Phytol* [Internet]. 2019 [citado: 20/07/2023]; 222(4): 1673-84. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/nph.15627>
27. Riveros-Maidana R, et al. "Sistema CRISPR/Cas: Edición genómica de precisión." *Mem Inst. Investig Cienc. Salud* [Internet]. 2020 [citado: 20/07/2023]; 18(1): 97-107. Disponible en http://scielo.iics.una.py/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1812-95282020000100097