

## Repeticiones palindrómicas cortas, agrupadas y regularmente interespaciadas (CRISPR) en bioarqueología - Revisión

Gabriel Dorado <sup>1</sup>, Fernando Luque <sup>2</sup>, Plácido Pascual <sup>3</sup>, Inmaculada Jiménez <sup>4</sup>, Francisco Javier S. Sánchez-Cañete <sup>5</sup>, Patricia Raya <sup>6</sup>, Jesús Sáiz <sup>7</sup>, Adela Sánchez <sup>7</sup>, Teresa E. Rosales <sup>8</sup>, Víctor F. Vásquez <sup>9</sup>

<sup>1</sup> Autor para correspondencia, Dep. Bioquímica y Biología Molecular, Campus Rabanales C6-1-E17, Campus de Excelencia Internacional Agroalimentario (ceiA3), Universidad de Córdoba, 14071 Córdoba (Spain), eMail: <bb1dopeg@uco.es>; <sup>2</sup> Laboratorio de Producción y Sanidad Animal de Córdoba, Ctra. Madrid-Cádiz km 395, 14071 Córdoba; <sup>3</sup> Laboratorio Agroalimentario de Córdoba, Consejería de Agricultura y Pesca, Junta de Andalucía, 14004 Córdoba; <sup>4</sup> IES Puertas del Campo, Avda. San Juan de Dios 1, 51001 Ceuta; <sup>5</sup> EE.PP. Sagrada Familia de Baena, Avda. Padre Villoslada 22, 14850 Baena (Córdoba); <sup>6</sup> Dep. Radiología y Medicina Física, Unidad de Física Médica, Facultad de Medicina, Avda. Menéndez Pidal s/n, Universidad de Córdoba, 14071 Córdoba; <sup>7</sup> Dep. Farmacología, Toxicología y Medicina Legal y Forense, Facultad de Medicina, Avda. Menéndez Pidal, s/n, Universidad de Córdoba, 14071 Córdoba; <sup>8</sup> Laboratorio de Arqueobiología, Avda. Universitaria s/n, Universidad Nacional de Trujillo, Trujillo (Peru); <sup>9</sup> Centro de Investigaciones Arqueobiológicas y Paleoecológicas Andinas Arqueobios, Apartado Postal 595, Trujillo (Peru)

### Resumen

La convergencia entre las ciencias sociales y experimentales se ha llevado a cabo para la bioarqueología. Ello ha sido posible porque los restos arqueológicos pueden ser analizados con metodologías de biología molecular, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), así como la secuenciación de ácidos nucleicos y péptidos (proteínas). Una consecuencia revolucionaria es la posibilidad de traer a la vida o restaurar especies previamente extintas. Ello ha representado un sueño científico desde hace algunos años, siendo ahora mucho más factible, gracias a un significativo avance tecnológico. Es conocido como repeticiones palindrómicas cortas, agrupadas y regularmente interespaciadas (CRISPR). En resumen, permite editar genomas, incluyendo los modernos y antiguos. Entre otros ejemplos, los genomas del elefante actual y mamut extinto pueden ser comparados, permitiendo editar el primero para asemejarlo al segundo. Así, la tecnología CRISPR se está convirtiendo en algo realmente excitante, con gran potencial no solo en medicina y mejora de plantas y animales, sino también en bioarqueología.

**Palabras clave:** CRISPR/Cas9, cisgénico, desextinción, paloma migratoria, arqueobiología.

### Abstract

Convergence between social and experimental sciences has been accomplished for bioarchaeology. That has been possible since archaeological remains can be analyzed with molecular-biology methodologies, like Polymerase Chain-Reaction (PCR), as well as nucleic-acid and peptide (protein) sequencing. A revolutionary consequence is the possibility to bring to life or restore extinct species. That has been a scientific dream for some years, and now is much more feasible, due to a recent technological breakthrough. That is known as Clustered Regularly-Interspaced Short-Palindromic Repeats (CRISPR). In short, it allows to edit genomes, including modern and ancient ones. Among other examples, current elephant and extinct mammoth genomes could be compared, to edit the former and to make it to resemble the latter. Thus, CRISPR technology is becoming certainly exciting, holding a great potential not only in medicine and plant and animal breeding, but also in bioarchaeology.

**Key words:** CRISPR/Cas9, cisgenic, de-extinction, passenger pigeon, archaeobiology.

## Introducción

Resulta interesante constatar que la curiosidad ha impulsado los avances humanos. De hecho, se cree que los neandertales (*Homo sapiens neanderthalensis*) y otras subespecies humanas como denisovanos (*Homo sapiens denisova*) se extinguieron (Dorado et al, 2010) porque tenían menos curiosidad que los humanos modernos (*Homo sapiens sapiens*). De esta manera, las subespecies ahora extintas vivían en menos lugares en comparación con el último, que se extendió por todo el mundo. Incluso así, estuvimos cerca de la extinción por lo menos tres veces en nuestra evolución biológica: i) hace 1'2 millones de años (*Homo sapiens*, *Homo ergaster* y *Homo erectus* tenían una población mundial de ~18.000 personas); ii) hace 150.000 años (etapa glacial, con solo ~600 sobrevivientes humanos); y iii) hace 70.000 años (explosión de Toba en Sumatra, dejando entre 1.000 y 10.000 personas).

La arqueología es un área de investigación fascinante. Así, permite descubrir hechos antiguos que de otro modo serían desconocidos. Hasta hace poco, este área del conocimiento era considerado y clasificado dentro de las ciencias sociales (incluyendo las artes y las humanidades), pero ahora también se considera dentro de las ciencias experimentales. Este es el caso, por ejemplo, de la revista "Journal of Archaeological Science", que está indexada en ambas áreas del "Journal Citation Reports" (JCR) de la "Web of Science" (WoS) de Clarivate Analytics (antes, Thomson Reuters) <<http://apps.webofknowledge.com>>. Esta convergencia ha tenido lugar porque ahora es posible analizar restos arqueológicos utilizando metodologías de biología molecular. Esto se ha logrado con técnicas como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR; del inglés, "Polymerase Chain-Reaction"), así como la secuenciación de ácidos nucleicos y péptidos. Dichas metodologías se han potenciado aún más con avances sustanciales en informática, incluyendo hardware (por ejemplo, microprocesadores con múltiples núcleos) y algoritmos de software (bioinformática). Todo ello conduce a la bioarqueología a un territorio nuevo y excitante, cerca del estudio de entidades vivientes, como viroides, virus virusoides y celulares (procariotas y eucariotas).

Una consecuencia emocionante de la convergencia entre estas ciencias es la posibilidad de traer a la vida especies previamente extintas, lo que se consideraba imposible hace apenas unos años. Este es, sin duda, un avance sugerente. Bienvenido a la desextinción (a veces, erróneamente nombrada como resurrección, que tiene un significado diferente, relacionado con la religión). Tal sueño científico es ahora mucho más factible, gracias a los nuevos logros tecnológicos, como se describe a continuación. Una vez más, la curiosidad humana y las innovaciones están impulsando los avances científicos y logros prácticos...

## Repeticiones palindrómicas cortas, agrupadas y regularmente interespaciadas

Las repeticiones palindrómicas cortas, agrupadas y regularmente interespaciadas (CRISPR; del inglés, "Clustered Regularly-Interspaced Short-Palindromic Repeats") representan una tecnología, revolucionaria que permite

editar ácidos nucleicos *in vitro* e *in vivo* (Mojica y Montoliu, 2016). Al igual que con algunos otros desarrollos tecnológicos, la base molecular de este proceso fue descubierta por casualidad. En tal momento, se consideró una mera curiosidad (secuencias de ADN con fragmentos de repeticiones cortas de bases nucleotídicas). De hecho, el origen y el uso de las subsecuencias interespaciadas no se conocían en ese momento. Curiosamente, más tarde se demostró que CRISPR representa el único sistema de inmunidad adaptativa de procariontes (Marraffini, 2015; Jackson et al, 2017). Por otro lado, la endonucleasa Cas9 es un sistema de cuatro componentes que incluye dos moléculas pequeñas de ARN denominadas CRISPR ARN (crRNA), ARN CRISPR trans-activador (tracrRNA; del inglés, “trans-activating CRISPR RNA”; que se une al crRNA y forma un complejo activo) y RNasa III (Barrangou, 2015). Esto constituye el sistema CRISPR-Cas9.

En resumen, cuando las bacterias sufren infecciones virales, a veces pueden sobrevivir y almacenar partes de tales genomas de virus, como una especie de memoria molecular. Funciona de la siguiente manera: i) los fragmentos de ADN del virus (conocidos como espaciadores) se almacenan en matrices CRISPR, dentro del genoma bacteriano; ii) los espaciadores se transcriben en pequeñas guías de ARN; iii) dichas guías se unen a proteínas como la “proteína 9 asociada a CRISPR” (Cas9); y iv) esta última es una enzima endonucleasa de ADN guiada por ARN, que puede reconocer y cortar el ADN mediante hibridación con la plantilla de ARN asociada (previamente transcrita a partir del ADN del virus). Por lo tanto, una estrategia tan elegante puede reconocer y destruir el ADN exógeno al que se había expuesto previamente la bacteria, en caso de que se produzca una infección futura (Fig. 1). Pero, curiosamente, no todos los procariontes contienen sistemas CRISPR (Grissa et al, 2007; Rousseau et al, 2009). Así, se han identificado en el 45% de las bacterias y el 87% de las arqueas cuyos genomas se han secuenciado hasta ahora (6,782 y 232, respectivamente), según aparece en “CRISPRs web server” <<http://crispr.i2bc.paris-saclay.fr>>.

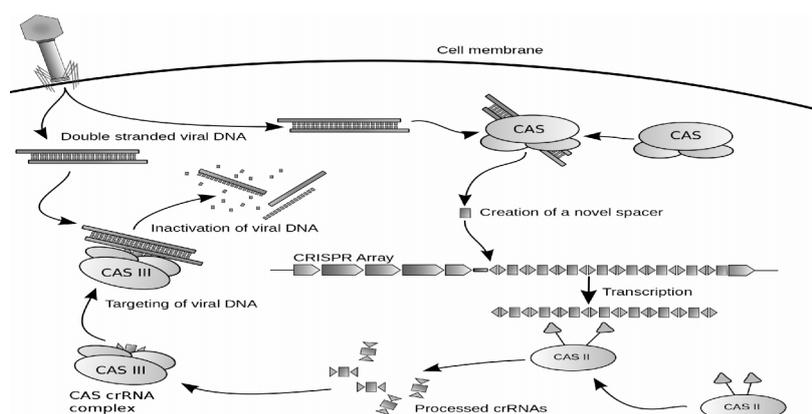


Figura N° 1. Sistema de defensa bacteriana CRISPR/Cas9. Las proteínas Cas se unen a ADN extraño, lo que permite generar matrices CRISPR que contienen dichas secuencias, que se transcriben posteriormente. Dicho ARN es procesado por proteínas Cas II para generar fragmentos (crRNA) que se unen a proteínas Cas III. De esta manera, este último ARN puede hibridar con el ADN exógeno y destruirlo, si se produce una infección adicional. © 2017 Danandmike, Wikimedia Commons <<http://commons.wikimedia.org>> y Creative Commons <<http://creativecommons.org>>.

Curiosamente, este sistema inmunológico bacteriano puede ser manipulado y explotado como una herramienta poderosa y flexible de edición del genomas (Gasiunas et al, 2012; Jinek et al, 2012; Singh et al, 2016; Yi y Li, 2016; Kan et al, 2017). De esta manera, se puede utilizar ARN guía (ARNg) sintético para dirigirlo hacia cualquier sitio genómico. Así, las secuencias genómicas (genes de interés, etc.) se pueden eliminar o agregar según se desee. Por lo tanto, CRISPR se puede aplicar para editar genomas sin usar ácidos nucleicos de otras especies. De esta manera, las construcciones resultantes serían cisgénicas, en lugar de transgénicas (que contienen material genético de otras especies).

### CRISPR en bioarqueología

CRISPR podría ser aprovechado para editar genomas actuales, de modo que contengan genes deseados de especies extintas. Esto puede lograrse comparando ADN moderno y antiguo (ADNa) de tales especies. Las características de interés pueden incluir productividad y resistencia a estreses abióticos (inundaciones, sequías, salinidad, altas o bajas temperaturas, etc.) y bióticos (enfermedades y plagas). Esto es particularmente relevante para combatir la tendencia actual del calentamiento global y el cambio climático. Curiosamente, se sabe que neandertales y denisovanos tenían sistemas inmunes más fuertes que los humanos modernos. De hecho, se cruzaron con humanos modernos, que albergan algunos de tales genes (Dannemann et al, 2016; Deschamps et al, 2016). La información sobre sistemas inmunes antiguos y más fuertes podría explotarse, por ejemplo, para hacer que el ganado sea menos propenso a enfermedades.

Por otra parte, se han propuesto varios proyectos para restaurar especies extintas (Dorado et al, 2013). Curiosamente, CRISPR ha aumentado las posibilidades de lograr tal sueño científico de traer especies extintas a la vida. Una de ellas es el mamut lanudo (*Mammuthus primigenius*), que se extinguió hace unos 4.000 años, probablemente por el cambio climático y la caza humana excesiva. Algunos investigadores están tratando de utilizar núcleos arqueológicos para clonar la especie, utilizando elefantes modernos como hembras gestantes sustitutas. Además, la tecnología CRISPR podría ser utilizada para editar genomas de elefantes actuales, para hacerlos resistentes al frío y peludos. Un enfoque es el uso de células inmaduras que se diferencian en espermatozoides u óvulos [conocidas como células germinales primordiales (PGC; del inglés, "Primordial Germ Cells")], para editar los genomas modernos a fin de que se parezcan a los correspondientes extintos. De esta manera, un parque natural podría ser creado para ellos en zonas frías, como Siberia. Otro proyecto de desextinción actualmente en consideración es el de la paloma migratoria (*Ectopistes migratorius*). Millardos de estas aves fueron extinguidas por la caza humana excesiva a finales del siglo XIX en Norteamérica (Reardon, 2016).

## Perspectivas futuras y conclusiones

Ahora está claro que CRISPR representa una revolución para las ciencias que se ocupan de los organismos vivos, como la medicina (por ejemplo, para curar enfermedades como la diabetes), así como la mejora de plantas y animales. Pero esta potente tecnología también tiene un gran potencial para las ciencias que trabajan con entidades o partes de ellas que alguna vez estuvieron vivas, como la bioarqueología. En este sentido, y teniendo en cuenta estudios de ADN y cultivos de embriones de maíces arqueológicos (Vásquez et al, 2011), los genomas de estos y maíces modernos se podrían comparar, para editar los últimos y asemejarlos a los primeros, a fin de luchar contra estreses abióticos y bióticos, incrementar la productividad, etc. De hecho, el número de publicaciones sobre CRISPR está creciendo exponencialmente, como se puede comprobar considerando las revisiones que se publicaron tan solo en 2017, hasta el momento de redactar este artículo (Biagioni et al, 2017; Carroll y Zhou, 2017; Chin et al, 2017; Chira et al, 2017; Chuai et al, 2017; DeLaFuente-Núñez y Lu, 2017; Doerflinger et al, 2017; Doetschman y Georgieva, 2017; Fellmann et al, 2017; Gee et al, 2017, Gerace et al, 2017; Gibson y Yang, 2017; Goren et al, 2017; Jiang y Doudna, 2017; Komor et al, 2017; Li et al, 2017; Lu et al, 2017; Mao et al, 2017; Mout et al, 2017; Murovec et al, 2017; Puchta, 2017; Puschnik et al, 2017; Sayin y Papagiannakopoulos, 2017; Shen et al, 2017; Shmakov et al, 2017; Stout et al, 2017; VanDiemen y Lebbink, 2017; Zischewski et al, 2017). Este crecimiento exponencial de publicaciones se asemeja a otras revoluciones recientes en las ciencias de la vida, causadas por el desarrollo de tecnologías innovadoras como la PCR, así como la secuenciación de segunda generación (SGS; del inglés, “Second-Generation Sequencing”) y la secuenciación de tercera generación (TGS; del inglés, “Third-Generation Sequencing”) a veces nombrada con el nombre ambiguo de secuenciación de “siguiente” generación (NGS; del inglés, “Next-Generation Sequencing”). Curiosamente, estos avances también tuvieron –y tienen ahora– impactos revolucionarios en la bioarqueología (Dorado et al, 2007-2009, 2011, 2013-2016).

Un ejemplo parcial, pero ilustrativo del potencial de CRISPR incluye la generación de descendientes deseados, evitando el sacrificio de machos o hembras (de hecho, la empresa eggXYt <<https://www.eggxyt.com>> acaba de anunciarlo para los pollos). Del mismo modo, asegurar que el ganado es descornado, careciendo de cuernos largos peligrosos. Otras aplicaciones potenciales interesantes son la generación de animales domésticos con CRISPR integrado (CRISPi) en sus genomas (no debe confundirse con CRISPI, que es una base de datos CRISPR interactiva, publicada por Rousseau et al, 2009). Esto facilitará la edición de genomas y producción de fármacos, tal como se propone para los pollos CRISPi. Esta tecnología también podría aplicarse para generar mosquitos genéticamente modificados, luchar e incluso erradicar enfermedades devastadoras, como el dengue o la causada por el virus del Zika. Esto puede lograrse efectivamente utilizando genética dirigida (del inglés, “gene drive”), que son elementos-genéticos egoístas sintéticos, que aseguran que casi todos los descendientes heredan dos copias del gen deseado. Por lo tanto, el gen seleccionado se propaga y se instaura en la población de forma efectiva en las generaciones futuras. Por ejemplo, se ha

desarrollado genética dirigida para combatir e incluso erradicar la malaria, conocida también como paludismo (Alphey, 2016), ya sea haciendo mosquitos resistentes al parásito de la malaria (Gantz et al, 2015) o generando hembras estériles (Hammond et al, 2016). El primer enfoque haría *Anopheles stephensi* menos propenso a transmitir la malaria, mientras que el segundo tiene el potencial de exterminar *Anopheles gambiae*, eliminando efectivamente sus poblaciones (Reardon, 2016). De hecho, esta última estrategia (aunque esterilizando a los machos con rayos X) ha sido exitosa para erradicar la horrible miasis de algunas áreas, como la causada por la mosca carnívora llamada *Cochliomyia hominivorax* (Kouba, 2004).

Otra aplicación de CRISPR es la generación de pequeñas plantas que puedan ser fácilmente cultivadas en sets, facilitando la recolección mecánica. Del mismo modo, para los animales pequeños, como microcerdos que crecen a unos 15 kg, para la investigación y como mascotas. Esta tecnología también se puede aplicar para cambiar el tamaño, color y patrones de los peces como la carpa koi. También, a gatos y perros, incluyendo los policías, guías y pastores. El uso de CRISPR para diseñar mascotas ha sido criticado por ser frívolo y quizá perjudicar el bienestar animal. Sin embargo, eso es equivalente a la cría mendeliana clásica, y, de hecho, CRISPR podría ser utilizado para eliminar características indeseables, como sucede con muchas razas de perros. Por otra parte, roedores, hurones, titíes y otros monos se utilizan como modelos de enfermedades en investigación biomédica, y están siendo modificados por CRISPR para encajar mejor en tal propósito. Otro ejemplo notable para aplicar CRISPR para la investigación de la neurociencia es la musarañita (*Suncus etruscus*), que es el mamífero más pequeño que se conoce, con aproximadamente 1,8 gramos y cerebro diminuto (Reardon, 2016).

Finalmente, al igual que ocurre con algunos avances, CRISPR plantea preocupaciones bioéticas, principalmente para la edición de líneas germinales, las cuales deben considerarse adecuadamente. Como un mecanismo de seguridad, y para evitar posibles consecuencias inesperadas de la liberación de plantas o animales modificadas genéticamente al medio ambiente, se ha desarrollado la genética dirigida inversa, anulando eficazmente las construcciones originales. De igual manera, asegurar que los individuos sean estériles, de modo que no puedan reproducirse si escapan de donde están confinados, como laboratorios de investigación, granjas o campos en cultivo (Reardon, 2016). En última instancia, es obvio que CRISPR tiene un gran potencial para mejorar la vida humana. Sin embargo, para evitar el rechazo irracional del público en general, que puede tener efectos devastadores, bloqueando el desarrollo tecnológico humano y el bienestar, la información sobre tal tecnología debe ser revelada completamente. Además, los científicos y los educadores también deben explicarlo adecuadamente, con el apoyo político apropiado. Como actualmente se hace con la insulina transgénica, que se inyecta en el cuerpo, y, sin embargo –por supuesto–, salva millones de vidas en todo el mundo cada día.

*Agradecimientos.* Financiado por Ministerio de Economía y Competitividad (proyecto MINECO BIO2015-64737-R) e Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (MINECO e INIA RF2012-00002-C02-02); Consejería de Agricultura y Pesca (041/C/2007,

75/C/2009 y 56/C/2010), Consejería de Economía, Innovación y Ciencia (P11-AGR-7322 y P12-AGR-0482) y Grupo PAI (AGR-248) de Junta de Andalucía; y Universidad de Córdoba (Ayuda a Grupos), Spain.

## Referencias Bibliográficas

Alphey L (2016): Can CRISPR-Cas9 gene drives curb malaria? *Nat Biotechnol* 34:149-150.

Barrangou R (2015): Diversity of CRISPR-Cas immune systems and molecular machines. *Genome Biol* 16: 247 ( pp).

Biagioni A, Chillà A, Andreucci E, Laurenzana A, Margheri F, Peppicelli S, Del Rosso M, Fibbi G (2017): Type II CRISPR/Cas9 approach in the oncological therapy. *J Exp Clin Cancer Res* 36: 80 (8 pp).

Carroll M, Zhou X (2017): Panacea in progress: CRISPR and the future of its biological research introduction. *Microbiol Res* 201: 63-74.

Chin WX, Ang SK, Chu JJ (2017): Recent advances in therapeutic recruitment of mammalian RNAi and bacterial CRISPR-Cas DNA interference pathways as emerging antiviral strategies. *Drug Discov Today* 22: 17-30.

Chira S, Gulei D, Hajitou A, Zimta AA, Cordelier P, Berindan-Neagoe I (2017): CRISPR/Cas9: Transcending the Reality of Genome Editing. *Mol Ther Nucleic Acids* 7: 211-222.

Chuai GH, Wang QL, Liu Q (2017): In Silico Meets In Vivo: Towards Computational CRISPR-Based sgRNA Design. *Trends Biotechnol* 35: 12-21.

Dannemann M, Andrés AM, Kelso J (2016): Introgression of Neandertal- and Denisovan-like haplotypes contributes to adaptive variation in human toll-like receptors. *Am J Hum Genet* 98: 22-33.

DeLaFuente-Núñez C, Lu TK (2017): CRISPR-Cas9 technology: applications in genome engineering, development of sequence-specific antimicrobials, and future prospects. *Integr Biol* 9: 109-122.

Deschamps M, Laval G, Fagny M, Itan Y, Abel L, Casanova JL, Patin E, Quintana-Murci L (2016): Genomic signatures of selective pressures and introgression from archaic hominins at human innate immunity genes. *Am J Hum Genet* 98: 5-21.

Doerflinger M, Forsyth W, Ebert G, Pellegrini M, Herold MJ (2017): CRISPR/Cas9-The ultimate weapon to battle infectious diseases? *Cell Microbiol* 19: e12693 (10 pp).

Doetschman T, Georgieva T (2017): Gene Editing With CRISPR/Cas9 RNA-Directed Nuclease. *Circ Res* 120: 876-894.

- Dorado G, Jiménez I, Rey I, Sánchez-Cañete FJS, Luque F, Morales A, Gálvez M, Sáiz J, Sánchez A, Rosales TE, Vásquez VF, Hernández P (2013): Genomics and proteomics in bioarchaeology - Review. *Archaeobios* 7: 47-63.
- Dorado G, Luque F, Pascual P, Jiménez I, Sánchez-Cañete FJS, Pérez-Jiménez M, Raya P, Gálvez M, Sáiz J, Sánchez A, Rosales TE, Vásquez VF, Hernández P (2015): Second-generation nucleic-acid sequencing and bioarchaeology - Review. *Archaeobios* 9: 216-230.
- Dorado G, Luque F, Pascual P, Jiménez I, Sánchez-Cañete FJS, Pérez-Jiménez M, Raya P, Sáiz J, Sánchez A, Martín J, Rosales TE, Vásquez VF, Hernández P (2016): Sequencing ancient RNA in bioarchaeology - Review. *Archaeobios* 10: 103-111.
- Dorado G, Rey I, Rosales TE, Sánchez-Cañete FJS, Luque F, Jiménez I, Gálvez M, Sáiz J, Sánchez A, Vásquez VF (2009): Ancient DNA to decipher the domestication of dog (REVIEW). *Archaeobios* 3: 127-132.
- Dorado G, Rey I, Rosales TE, Sánchez-Cañete FJS, Luque F, Jiménez I, Morales A, Gálvez M, Sáiz J, Sánchez A, Hernández P, Vásquez VF (2010): Biological mass extinctions on planet Earth (REVIEW). *Archaeobios* 4: 53-64.
- Dorado G, Rosales TE, Luque F, Sánchez-Cañete FJS, Rey I, Jiménez I, Morales A, Gálvez M, Sáiz J, Sánchez A, Vásquez VF, Hernández P (2011): Ancient nucleic acids from maize - A review. *Archaeobios* 5: 21-28.
- Dorado G, Sánchez-Cañete FJS, Pascual P, Jiménez I, Luque F, Pérez-Jiménez M, Raya P, Gálvez M, Sáiz J, Sánchez A, Rosales TE, Vásquez VF, Hernández P (2014): Starch genomics and bioarchaeology - Review. *Archaeobios* 8: 41-50.
- Dorado G, Vásquez V, Rey I, Luque F, Jiménez I, Morales A, Gálvez M, Sáiz J, Sánchez A, Hernández P (2008): Sequencing ancient and modern genomes (REVIEW). *Archaeobios* 2: 75-80.
- Dorado G, Vásquez V, Rey I, Vega JL (2007): Archaeology meets Molecular Biology (REVIEW). *Archaeobios* 1: 1-2.
- Fellmann C, Gowen BG, Lin PC, Doudna JA, Corn JE (2017): Cornerstones of CRISPR-Cas in drug discovery and therapy. *Nat Rev Drug Discov* 16: 89-100.
- Gantz VM, Jasinskiene N, Tatarenkova O, Fazekas A, Macias VM, Bier E, James AA (2015): Highly efficient Cas9-mediated gene drive for population modification of the malaria vector mosquito *Anopheles stephensi*. *Proc Natl Acad Sci USA* 112: E6736- E6743.

- Gasiunas G, Barrangou R, Horvath P, Siksnys V (2012): Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* 109: E2579-86.
- Gee P, Xu H, Hotta A (2017): Cellular Reprogramming, Genome Editing, and Alternative CRISPR Cas9 Technologies for Precise Gene Therapy of Duchenne Muscular Dystrophy. *Stem Cells Int* 2017: 8765154 (11 pp).
- Gerace D, Martiniello-Wilks R, Nassif NT, Lal S, Steptoe R, Simpson AM (2017): CRISPR-targeted genome editing of mesenchymal stem cell-derived therapies for type 1 diabetes: a path to clinical success? *Stem Cell Res Ther* 8: 62 (10 pp).
- Gibson GJ, Yang M (2017): What rheumatologists need to know about CRISPR/Cas9. *Nat Rev Rheumatol* 13: 205-216.
- Goren M, Yosef I, Qimron U (2017): Sensitizing pathogens to antibiotics using the CRISPR-Cas system. *Drug Resist Updat* 30: 1-6.
- Grissa I, Vergnaud G, Pourcel C (2007): The CRISPRdb database and tools to display CRISPRs and to generate dictionaries of spacers and repeats. *BMC Bioinformatics* 23: 8:172.
- Hammond A, Galizi R, Kyrou K, Simoni A, Siniscalchi C, Katsanos D, Gribble M, Baker D, Marois E, Russell S, Burt A, Windbichler N, Crisanti A, Nolan T (2016): A CRISPR-Cas9 gene drive system targeting female reproduction in the malaria mosquito vector *Anopheles gambiae*. *Nat Biotechnol* 34: 78-83.
- Jackson SA, McKenzie RE, Fagerlund RD, Kieper SN, Fineran PC, Brouns SJ (2017): CRISPR-Cas: Adapting to change. *Science* 356: eaal5056 (10 pp).
- Jiang F, Doudna JA (2017): CRISPR-Cas9 Structures and Mechanisms. *Annu Rev Biophys* 46: 505-529.
- Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E (2012): A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 337: 816-821.
- Kan Y, Ruis B, Takasugi T, Hendrickson EA (2017): Mechanisms of precise genome editing using oligonucleotide donors. *Genome Res* 27: 1099-1111.
- Komor AC, Badran AH, Liu DR (2017): CRISPR-Based Technologies for the Manipulation of Eukaryotic Genomes. *Cell* 168: 20-36.
- Kouba V (2004): History of the screwworm (*Cochliomyia hominivorax*) eradication in the Eastern Hemisphere. *Hist Med Vet* 29: 43-53.
- Li Y, Song YH, Liu B, Yu XY (2017): The potential application and challenge of powerful CRISPR/Cas9 system in cardiovascular research. *Int J Cardiol* 227: 191-193.

- Lu Q, Livi GP, Modha S, Yusa K, Macarrón R, Dow DJ (2017): Applications of CRISPR genome editing technology in drug target identification and validation. *Expert Opin Drug Discov* 12: 541-552.
- Mao Y, Botella JR, Zhu JK (2017): Heritability of targeted gene modifications induced by plant-optimized CRISPR systems. *Cell Mol Life Sci* 74: 1075-1093.
- Marraffini LA (2015): CRISPR-Cas immunity in prokaryotes. *Nature* 526: 55-61.
- Mojica FJ, Montoliu L (2016): On the Origin of CRISPR-Cas Technology: From Prokaryotes to Mammals. *Trends Microbiol* 24: 811-820.
- Mout R, Ray M, Lee YW, Scaletti F, Rotello VM (2017): In Vivo Delivery of CRISPR/Cas9 for Therapeutic Gene Editing: Progress and Challenges. *Bioconjug Chem* 28: 880-884.
- Murovec J, Pirc Z, Yang B (2017): New variants of CRISPR RNA-guided genome editing enzymes. *Plant Biotechnol J* 15: 917-926.
- Puchta H (2017): Applying CRISPR/Cas for genome engineering in plants: the best is yet to come. *Curr Opin Plant Biol* 36: 1-8.
- Puschnik AS, Majzoub K, Ooi YS, Carette JE (2017): A CRISPR toolbox to study virus-host interactions. *Nat Rev Microbiol* 15: 351-364.
- Reardon S (2016): The CRISPR zoo. *Nature* 531: 160-163.
- Rousseau C, Gonnet M, LeRomancer M, Nicolas J (2009): CRISPI: a CRISPR interactive database. *Bioinformatics* 25: 3317-3318.
- Sayin VI, Papagiannakopoulos T (2017): Application of CRISPR-mediated genome engineering in cancer research. *Cancer Lett* 387: 10-17.
- Shen S, Loh TJ, Shen H, Zheng X, Shen H (2017): CRISPR as a strong gene editing tool. *BMB Rep* 50: 20-24.
- Shmakov S, Smargon A, Scott D, Cox D, Pyzocha N, Yan W, Abudayyeh OO, Gootenberg JS, Makarova KS, Wolf YI, Severinov K, Zhang F, Koonin EV (2017): Diversity and evolution of class 2 CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol* 15: 169-182.
- Singh A, Chakraborty D, Maiti S (2016): CRISPR/Cas9: a historical and chemical biology perspective of targeted genome engineering. *Chem Soc Rev* 45: 6666-6684.
- Stout E, Klaenhammer T, Barrangou R (2017): CRISPR-Cas Technologies and Applications in Food Bacteria. *Annu Rev Food Sci Technol* 8: 413-437.

VanDiemen FR, Lebbink RJ (2017): CRISPR/Cas9, a powerful tool to target human herpesviruses. *Cell Microbiol* 19: e12694 (9 pp).

Vásquez VF, Rosales TE, Dorado G (2011): Estudio de la respuesta al cultivo de semillas y embriones de maíz (*Zea mays*) antiguo de la época Chimú (1420 años d.C.). *Archaeobios* 5: 4-15.

Yi L, Li J (2016): CRISPR-Cas9 therapeutics in cancer: promising strategies and present challenges. *Biochim Biophys Acta* 1866: 197-207.

Zischewski J, Fischer R, Bortesi L (2017): Detection of on-target and off-target mutations generated by CRISPR/Cas9 and other sequence-specific nucleases. *Biotechnol Adv* 35: 95-104.

