

## OPTIMIZACIÓN DE ADN DONADOR PARA SU USO EN PROTOCOLOS DE EDICIÓN GÉNICA BASADOS EN EL SISTEMA CRISPR/Cas9

Los métodos actuales de edición génica se basan en la recombinación homóloga que hace uso de brazos de homología en el transgen, sin embargo, existen nuevas estrategias que potencian este proceso como es la microhomología mediada por la Integración dirigida independiente de homología (HITI, por sus siglas en inglés), en la cual una secuencia, tanto en el ADN donador como el gen diana, es reconocida por el ARN guía del sistema CRISPR/Cas9. En base a esto, se propone realizar el mejoramiento en el método de entrega de ADN donador para el knock-in (KI) de la proteína verde fluorescente tanto por recombinación homóloga como por microhomología utilizando diferentes productos de PCR. Utilizando diferentes productos de PCR como ADN donadores se observó que el donador que posee brazos de homología y la secuencia HITI presenta un porcentaje de integración del 81% generando una población más homogénea que expresa la proteína verde fluorescente. El donador que solo tiene brazos de homología presenta una integración del 57% y los que contienen solo la secuencia HITI su porcentaje de integración es de un 9%, analizados a 11 días post-nucleofección. Se llegó a la conclusión que la eliminación de los brazos de homología permite una mayor entrada de ADN donador pero que disminuye su especificidad provocando más sitios off-targets e integraciones al azar. Con lo que, el método ideal es el uso de brazos de homología con la secuencia HITI para el proceso de knock-in con el sistema CRISPR/Cas9.

Palabras clave: Edición génica, CRISPR/Cas9, off-targets, microhomología, knock-in, HITI