

CRISPR-Cas: DE LA INMUNIDAD PROCARIOTA A LA REVOLUCIÓN DE LA EDICIÓN GENÓMICA MULTIDISCIPLINARIA

Cáceres-Durán, Miguel Ángel ¹ 

1. Centro de Citricultura “Sylvio Moreira”, Instituto Agronômico de Campinas, Cordeirópolis, São Paulo, Brasil.

EMAIL: macdur@gmail.com

CORRESPONDENCIA: Centro de Citricultura “Sylvio Moreira”, Instituto Agronômico de Campinas, Cordeirópolis, São Paulo, Brasil.

RESUMEN

El sistema CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) asociado a proteínas Cas ha evolucionado de un mecanismo de inmunidad adaptativa en procariontes a convertirse en la plataforma de edición genómica más versátil y precisa de la biotecnología moderna. Esta revisión examina la arquitectura del locus CRISPR y las fases mecánicas de adaptación, biogénesis e interferencia. Se analiza la transición desde la nucleasa Cas9 convencional hacia tecnologías de nueva generación, como el *base editing* y el *prime editing*, que permiten modificaciones quirúrgicas sin rupturas de doble cadena. Asimismo, se discute el impacto de la inteligencia artificial en la optimización de ARN guías y se detallan sus

aplicaciones críticas en la salud humana, la biotecnología industrial y el mejoramiento vegetal.

Finalmente, se abordan los desafíos actuales en eficiencia de reparación y los dilemas éticos que rodean su implementación global.

PALABRAS CLAVE: Edición genómica; CRISPR-Cas; Terapia génica; Mejora genética vegetal; Biotecnología industrial.

CRISPR-Cas: FROM PROKARYOTIC IMMUNITY TO THE MULTIDISCIPLINARY GENOME EDITING REVOLUTION

ABSTRACT

The Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR)-Cas system has evolved from a prokaryotic adaptive immune mechanism into the most versatile and precise genome editing platform in modern biotechnology. This review examines the architecture of the CRISPR locus and the mechanical phases of adaptation, biogenesis, and interference. It analyzes the transition from conventional Cas9 nucleases to next-generation technologies, such as base editing and prime editing, which enable surgical modifications without double-strand breaks. Furthermore, it discusses the impact of artificial intelligence on guide RNA optimization and details its critical applications in human health, industrial biotechnology, and plant breeding. Finally, the review addresses current challenges in repair efficiency and the ethical dilemmas surrounding its global implementation.

KEYWORDS: dental caries; emerging technologies; prevention; artificial intelligence; bioactive materials.

INTRODUCCIÓN

La supervivencia de bacterias y arqueas ha dependido, durante más de mil millones de años, de una constante carrera armamentista frente a la amenaza persistente de virus y elementos genéticos móviles (MGE). En respuesta a esta presión evolutiva, los procariontes han desarrollado un sofisticado arsenal de defensa que incluye tanto estrategias de inmunidad innata como un sistema de inmunidad adaptativa y heredable denominado CRISPR-Cas basado en secuencias CRISPR (Repeticiones Palindrómicas Cortas Agrupadas y Regularmente Espaciadas y proteínas asociadas Cas (1).

A diferencia de los mecanismos de restricción clásicos, la tecnología CRISPR permite una respuesta específica y programable. Esta capacidad del sistema CRISPR-Cas para atacar secuencias de ADN mediante ARNs guía ha transformado la biotecnología moderna, abriendo nuevas vías en la edición genómica de una amplia gama de organismos. Debido a su versatilidad, esta herramienta presenta un alto potencial en aplicaciones terapéuticas, industriales y agrícolas, permitiendo desde la corrección de enfermedades genéticas hasta el desarrollo de cultivos resilientes al cambio climático (2,3).

Conceptualización y Arquitectura del Sistema CRISPR-Cas

El sistema CRISPR-Cas se define conceptualmente como un módulo de memoria molecular que permite a los procariontes registrar encuentros biológicos con agentes externos. Esta capacidad de "archivo" reside en la estructura del locus CRISPR, una región genómica organizada de forma jerárquica: las secuencias repetitivas actúan como marcos estructurales, mientras que los espaciadores fungen como unidades de información específica derivadas de plásmidos o bacteriófagos (4).

Estructuralmente, el locus está precedido por una secuencia líder rica en AT que funciona como promotor y coordina la

arquitectura del array. Un aspecto crítico de esta organización es su polaridad de adquisición: los nuevos espaciadores se integran preferencialmente en el extremo proximal a la secuencia líder, lo que permite establecer una cronología evolutiva donde los espaciadores más cercanos al líder representan las infecciones más recientes (5,6).

Desde un punto de vista evolutivo, la relevancia de este sistema radica en su naturaleza heredable y su papel en la coevolución hospedero-fago. Esta dinámica ha impulsado una carrera armamentista molecular donde los bacteriófagos han desarrollado proteínas Anti-CRISPR (Acr), capaces de inactivar específicamente los complejos Cas del hospedero. Esta presión constante obliga a los procariontes a

diversificar sus sistemas de defensa, generando una plasticidad genómica altamente adaptable (7).

Dinámica Funcional: El Ciclo de Inmunidad

La operatividad del sistema se divide en cuatro fases mecánicas que transforman un fragmento de ADN invasor en una señal de defensa activa (Figura 1) (1,8,9):

1. Adaptación (captura del sustrato):

el complejo proteico Cas1-Cas2 actúa como una unidad funcional mínima que escanea el material genético exógeno en busca de señales específicas. Al detectar un invasor, selecciona un segmento de ADN —denominado

protoespaciador— adyacente a un motivo PAM (*protospacer adjacent motif*, una corta secuencia conservada esencial para el reconocimiento del ADN extraño)— y lo integra en la matriz CRISPR. Este paso es fundamental, ya que define la especificidad del sistema (paso 1, figura 1) (10-13). Además, en algunos sistemas CRISPR-Cas, la interferencia incompleta frente a un ADN invasor —por ejemplo, debido a desajustes en la complementariedad o a la presencia de un PAM subóptimo— puede inducir un fenómeno conocido como *primed adaptation*. Este proceso incrementa significativamente la adquisición de nuevos espaciadores

a partir del mismo elemento genético invasor, reforzando la memoria inmunológica y mejorando la respuesta frente a variantes virales que han escapado parcialmente al reconocimiento inicial (14).

2. Transcripción (Activación de la Memoria): el archivo de memoria almacenado en el locus CRISPR se activa mediante la transcripción, generando un transcrito largo de ARN conocido como pre-crRNA (paso 2, Figura 1). Este ARN primario contiene las secuencias de los espaciadores flanqueadas por repeticiones (15).

3. Biogénesis y Procesamiento (Generación de la Guía): en esta

etapa, el pre-crRNA es procesado para convertirse en unidades funcionales. Mediante la hibridación con ARN auxiliares (tracrRNA) y la acción de la maquinaria enzimática de la RNasa III, el precursor se fragmenta en pequeñas unidades de ARN guía o crRNAs maduros, que se ensamblan con la nucleasa Cas9 para formar el complejo efector (paso 3, Figura 1) (15).

4. Interferencia (Silenciamiento Génico): la fase efectora ocurre cuando el complejo de ribonucleoproteína patrulla el citoplasma. Ante un evento de reinfección (paso 4, figura 1), el reconocimiento del ADN diana se rige por la complementariedad de

bases entre el ARN guía y la secuencia diana, pero también depende estrictamente de la presencia de un motivo adyacente al protoespaciador (PAM), previamente adquirido durante la fase de adaptación, el cual actúa como señal de reconocimiento y discriminación entre ADN propio y extraño (12,13). La unión del complejo Cas9–sgRNA depende de este motivo, el cual desencadena el desenrollamiento del ADN y la formación del R-loop. Asimismo, la región proximal al PAM, conocida

como *seed region*, presenta una alta sensibilidad a desajustes, lo que convierte al PAM en un determinante clave de la eficiencia y especificidad del sistema, variando según la nucleasa Cas involucrada (16). Este mecanismo garantiza una alta fidelidad en la respuesta inmune, evitando el autorreconocimiento del genoma bacteriano.

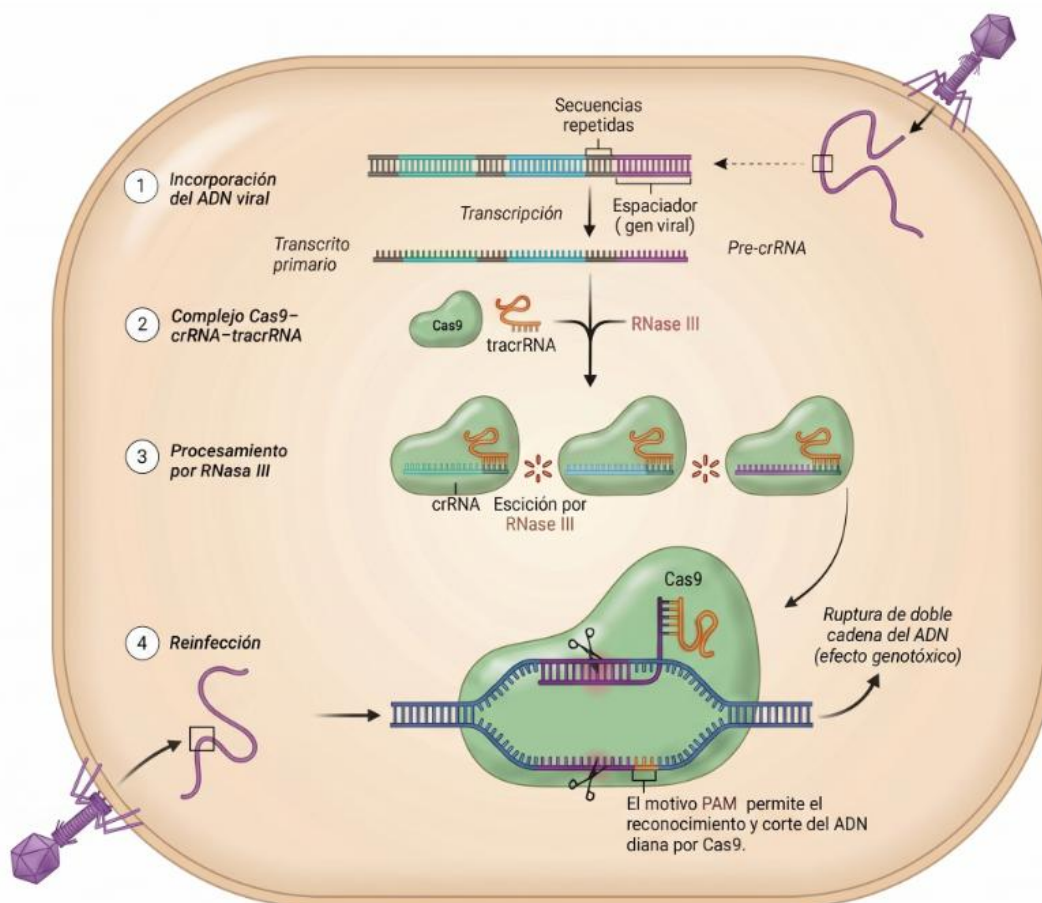


Figura 1. Ciclo de inmunidad adaptativa CRISPR-Cas y biogénesis del ARN guía. El ciclo se desarrolla en cuatro fases clave: **(1) Adaptación:** incorporación de espaciadores virales en el locus CRISPR por Cas1-Cas2. **(2) Transcripción:** generación del transcrito primario pre-crRNA. **(3) Procesamiento:** maduración del ARN guía mediante la RNasa III y formación del complejo Cas9-ARN. **(4) Interferencia:** reconocimiento del motivo PAM y corte del ADN diana durante una reinfeción. *Creado con Illustrae.co.*

De manera complementaria, la eficacia del sistema CRISPR-Cas en contextos naturales se encuentra modulada

por proteínas inhibitoras conocidas como anti-CRISPR (Acr), codificadas principalmente por bacteriófagos y otros

elementos genéticos móviles. Estas proteínas han evolucionado como mecanismos de evasión que interfieren directamente con distintos componentes del sistema CRISPR-Cas, ya sea bloqueando la unión del complejo Cas-ARN guía al ADN diana, impidiendo el reconocimiento del motivo PAM o inhibiendo la actividad nucleasa de las proteínas efectoras. La diversidad estructural y funcional de las Acr refleja una intensa coevolución entre procariotas y sus invasores virales, constituyendo un claro ejemplo de carrera armamentista molecular. Además, el estudio de estas proteínas ha abierto nuevas posibilidades biotecnológicas, particularmente en el desarrollo de sistemas de control fino de la actividad de CRISPR-Cas, mejorando su seguridad y

especificidad en aplicaciones terapéuticas (17,18).

Metodología de la Edición Genómica: La Transición a Herramienta Universal

La metamorfosis de CRISPR de un mecanismo biológico a una técnica de laboratorio supuso un salto cualitativo respecto a las tecnologías precedentes. Mientras que las ZFN y TALEN requerían un rediseño complejo de dominios proteicos para cada secuencia objetivo —un proceso costoso y propenso a errores—, la tecnología CRISPR trasladó la especificidad al ARN, simplificando drásticamente la ingeniería genética (19).

Reingeniería y Mecanismos de Reparación

La innovación clave para el uso biotecnológico fue la creación del ARN guía único (sgRNA). Esta quimera sintética fusiona los componentes naturales en una sola molécula, permitiendo que la nucleasa Cas9 sea dirigida con precisión quirúrgica hacia casi cualquier locus genómico (20).

El proceso metodológico concluye con el aprovechamiento de la respuesta celular ante la ruptura de la doble cadena (DSB) inducida por Cas9 (Figura 2):

- **Vía de Unión de Extremos No Homólogos (NHEJ):** es el mecanismo por defecto que busca restaurar la integridad física del ADN rápidamente. Debido a su falta de precisión, suele introducir pequeñas

inserciones o deleciones (*indels*), lo que resulta ideal para el *knock-out* génico o la interrupción de marcos de lectura en genes de susceptibilidad (21).

Vía de Recombinación Homóloga Dirigida

(HDR): una plataforma versátil para crear inserciones, deleciones y sustituciones de ADN precisas y específicas. Estas ediciones precisas son posibles gracias al uso de plantillas donantes exógenas que contienen la secuencia deseada. La HDR mediada por CRISPR-Cas9 se puede utilizar ampliamente para estudiar las funciones de las proteínas, modelar enfermedades y aplicar terapia génica. Sin embargo, la HDR se ve limitada por su baja eficiencia, especialmente en células postmitóticas (22). Aunque es menos frecuente en células somáticas de

plantas, su manipulación permite realizar ediciones precisas o inserciones de genes específicos (23).

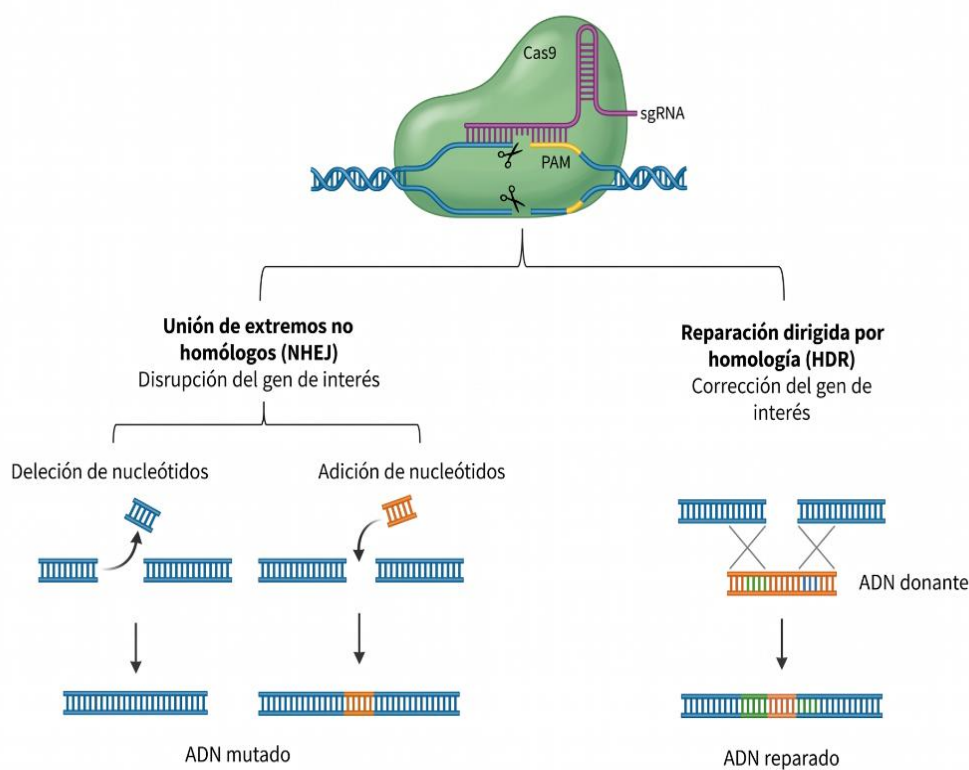


Figura 2. Vías de reparación celular empleadas en biotecnología mediante CRISPR-Cas9. Tras el corte dirigido por la nucleasa, se activan los mecanismos de reparación: la vía **NHEJ** (izquierda), que genera mutaciones por *indels* (ADN mutado), y la vía **HDR** (derecha), que permite la edición precisa mediante un ADN donante (ADN reparado). Creado con Illustrae.co.

Diversidad y Clasificación de los Sistemas

CRISPR-Cas

Para comprender el alcance de la edición genómica, es imperativo reconocer que el sistema CRISPR-Cas no es una entidad uniforme, sino una familia diversa de mecanismos de defensa. Según la variedad de genes *cas* y la naturaleza del complejo de interferencia, los sistemas CRISPR-Cas se han clasificado en dos clases, que a su vez se subdividen en seis tipos y varios subtipos, cada uno de los cuales posee genes *cas* característicos (8):

- **Clase 1 (Tipos I, III y IV):** se caracterizan por utilizar complejos de múltiples subunidades de proteínas Cas para la etapa de interferencia. Aunque son los más

abundantes en la naturaleza, su complejidad estructural ha limitado su adopción masiva como herramientas de ingeniería genética en organismos superiores (24-26)

- **Clase 2 (Tipos II, V y VI):** emplean una única proteína efectora de gran tamaño para ejecutar el corte del ácido nucleico. A esta clase pertenece el sistema Cas9 (Tipo II), cuya simplicidad —al requerir una sola proteína y un ARN guía— permitió su rápida transición del laboratorio a la aplicación clínica y agrícola. (24-26)

Dentro de la Clase 2, han surgido efectores que expanden las capacidades de Cas9. Por ejemplo, Cas12a (anteriormente Cpf1) genera cortes escalonados que facilitan la

inserción precisa de ADN y posee la capacidad intrínseca de procesar sus propios arreglos de ARN guía, simplificando la edición multigenética o *multiplexing* (27). Por otro lado, la familia Cas13 ha revolucionado el campo al dirigirse exclusivamente al ARN. Al actuar sobre el transcriptoma y no sobre el genoma, permite modulaciones temporales de la expresión génica, lo que resulta ideal para el desarrollo de agentes antivirales y herramientas de diagnóstico de alta sensibilidad (28,29)

A pesar de esta diversidad funcional y del potencial biotecnológico de los distintos sistemas CRISPR-Cas, su aplicación práctica continúa enfrentando limitaciones técnicas y biológicas que deben ser

consideradas para su implementación eficiente y segura.

Limitaciones y desafíos de la tecnología CRISPR-Cas

A pesar de su versatilidad, la tecnología CRISPR-Cas presenta una serie de limitaciones que condicionan su aplicación segura. El desafío más crítico radica en la actividad fuera de objetivo (OTA u *off-target*), que ocurre cuando el complejo ribonucleoproteico se une y corta secuencias genómicas con alta identidad, pero no perfectamente complementarias, al sitio diana. Estos eventos se complican por la tolerancia de los complejos CRISPR-Cas a desajustes (*mismatches*) o protuberancias en las bases de ADN y ARN, lo que puede

derivar en mutaciones no deseadas, alteraciones en la regulación génica e incluso transformaciones oncogénicas (30,31). La probabilidad de estos eventos depende de factores intrínsecos como la secuencia del sgRNA, la accesibilidad de la cromatina y la concentración de la nucleasa (32,33).

Otro aspecto crítico es la eficiencia variable de edición según la vía de reparación del ADN empleada. Mientras que la NHEJ es predominante y eficiente en la mayoría de las líneas celulares, la HDR —esencial para la edición de precisión— muestra una eficiencia muy baja en células somáticas y no proliferativas. Esta disparidad restringe la capacidad de realizar inserciones específicas o correcciones puntuales de manera masiva (34,35).

Asimismo, la entrega eficiente (*delivery*) de los componentes representa un obstáculo técnico significativo. Los sistemas actuales se dividen en vectores virales (como AAV) y métodos no virales (nanopartículas lipídicas o electroporación). Cada enfoque presenta un balance complejo entre eficiencia, capacidad de carga, especificidad y seguridad biológica, lo que condiciona su éxito dependiendo del organismo o tejido diana (36,37).

En el ámbito clínico, la inmunogenicidad es una preocupación creciente. Se ha reportado que la exposición a proteínas Cas derivadas de bacterias patógenas, como *Streptococcus pyogenes*, puede inducir respuestas inmunológicas preexistentes en humanos. Esto no solo compromete la eficacia

terapéutica, sino que plantea riesgos de seguridad que deben ser evaluados rigurosamente (38).

Finalmente, los aspectos éticos y regulatorios mantienen un debate abierto, especialmente en lo que respecta a la edición de la línea germinal. El potencial impacto transgeneracional de estas modificaciones exige la creación de marcos normativos internacionales robustos que garanticen un uso responsable y consensuado de la tecnología en aplicaciones humanas.

Herramientas de Precisión y Nuevos

Horizontes

Las limitaciones inherentes a la tecnología CRISPR-Cas, particularmente la dependencia de rupturas de doble cadena

(DSB) y de vías de reparación endógenas como NHEJ y HDR —frecuentemente impredecibles—, han impulsado el desarrollo de herramientas de edición más precisas y controladas. En este contexto, han surgido tecnologías innovadoras que permiten una edición “quirúrgica” del genoma, minimizando la generación de *indels* y otros subproductos no deseados.

El *base editing* permite la conversión directa de un nucleótido en otro sin necesidad de inducir una DSB ni requerir una plantilla de ADN donante. Esta estrategia emplea una variante de Cas9 catalíticamente inactiva (dCas9) o una nicasa (nCas9) fusionada a enzimas deaminasas, lo que posibilita modificaciones químicas específicas en bases individuales. Dentro de esta categoría

destacan los editores de citosina (CBE), que median la conversión de C-G a T-A, y los editores de adenina (ABE), responsables del cambio de A-T a G-C, cubriendo una proporción significativa de mutaciones puntuales asociadas a enfermedades humanas (39,40). Su principal ventaja radica en su alta eficiencia y en la reducción sustancial de mutaciones indeseadas en comparación con sistemas basados en DSB.

Por su parte, el *prime editing*, considerado un “procesador de textos” del genoma, ofrece una versatilidad sin precedentes al permitir la introducción de sustituciones, inserciones y deleciones precisas sin generar rupturas en ambas hebras del ADN. Esta tecnología combina una nCas9 fusionada a una transcriptasa inversa y un ARN guía especializado

denominado pegRNA (*prime editing guide RNA*), que actúa simultáneamente como guía y plantilla para la edición (41). Su capacidad de operar en células no proliferativas amplía significativamente su potencial en aplicaciones terapéuticas, incluyendo tejidos neurológicos y musculares, así como en la mejora genética de cultivos leñosos con ciclos de vida prolongados (42).

En conjunto, estas herramientas representan un cambio de paradigma en la edición genómica, al permitir modificaciones altamente específicas sin depender de mecanismos de reparación celular de baja precisión. Esta capacidad de introducir cambios puntuales de manera controlada reduce efectos pleiotrópicos no deseados y expande el alcance de CRISPR

hacia aplicaciones en medicina de precisión, biotecnología avanzada y agricultura de alto rendimiento.

Con el fin de sintetizar las principales diferencias entre las estrategias de edición genómica basadas en CRISPR, se presenta la

Tabla 1.

Tabla 1. Comparación entre tecnologías de edición genómica basadas en CRISPR

Característica	CRISPR-Cas9 (convencional)	Base Editing	Prime Editing
Mecanismo de acción	Nucleasa (Corte de doble cadena)	Desaminación química de bases	Búsqueda y reemplazo (Transcripción reversa)
Modificaciones posibles	<i>Indels</i> aleatorios (HHEJ) o inserciones (HDR)	Transiciones (C→T, G→A, A→G, T→C)	Las 12 sustituciones, <i>indels</i> pequeños y precisos
Ruptura de doble cadena (DSB)	Sí	No	No (solo corte de una hebra)
Dependencia de HDR	Sí (para edición precisa)	No	No
Componentes	Cas9 silvestre (<i>wild</i>)	dCas9 o nCas9 +	nCas9 +

efectores	<i>type</i>)	desaminasa	transcriptasa reversa
Sistema de guía	sgRNA	sgRNA modificado	pegRNA
Eficiencia en células somáticas	Baja para precisión (HDR limitada)	Alta	Variable (pero superior a HDR)
Precisión y subproductos	Baja (frecuentes <i>indels</i> aleatorios)	Alta (riesgo de <i>bystander editing</i>)	Muy alta (mínimos subproductos)
Eficiencia	Alta (NHEJ), baja (HDR)	Alta	Variable (dependiente del sistema)
Tipo de Cas utilizada	Cas9 (nucleasa activa)	dCas9 o nCas9 + deaminasa	nCas9 + transcriptasa reversa
Versatilidad	Alta para pérdida de función (Knock-out)	Limitada (solo transiciones específicas)	Máxima (versatilidad de cambios)
Limitaciones	Efectos off-target y mosaicismo	Ventana de edición rígida; limitado a transiciones	Diseño complejo de pegRNA y tamaño del vector

El desarrollo de herramientas de edición genómica cada vez más precisas y controladas ha permitido la expansión de las aplicaciones de CRISPR más allá del laboratorio, impactando significativamente áreas como la salud humana, la biotecnología industrial y la agricultura.

Aplicaciones de CRISPR en la salud humana

La terapia génica constituye uno de los principales campos de aplicación de CRISPR, al permitir la corrección o reemplazo de genes disfuncionales mediante la manipulación de los mecanismos de reparación celular. En este contexto, el sistema CRISPR/Cas9 puede inducir el silenciamiento génico a través de la vía NHEJ o facilitar el *knock-in* de

secuencias mediante la vía HDR utilizando plantillas de ADN funcional (43). Para maximizar la seguridad clínica de estos procesos, la convergencia con la inteligencia artificial (IA) ha marcado un hito en la ingeniería genómica. Según destacan Kim et al. (2025), el uso de modelos de aprendizaje profundo (*deep learning*) ha revolucionado el diseño de los ARN guía (sgRNA) al predecir con exactitud milimétrica tanto la actividad *on-target* como los riesgos *off-target*, superando las limitaciones de los algoritmos de generación anterior (44).

Esta integración de la IA no solo optimiza las herramientas convencionales, sino que es fundamental para la arquitectura de sistemas complejos como el *base editing* y el *prime editing*. Al permitir predecir los resultados de reparación

celular y seleccionar el editor más adecuado para cada mutación específica, la IA posiciona a CRISPR como una tecnología predictiva de alta fidelidad. Este avance acelera significativamente la transición hacia aplicaciones clínicas seguras y personalizadas, transformando la edición genómica en un proceso de precisión quirúrgica digital (45).

En el ámbito de la oncología, esta versatilidad ha revolucionado tanto la investigación como el desarrollo terapéutico. CRISPR ha simplificado la creación de modelos de cáncer y organoides, herramientas clave para comprender la genética tumoral y sus vulnerabilidades terapéuticas (46). A nivel clínico, permite optimizar estrategias de inmunoterapia mediante la edición

multiplex de células CAR-T, eliminando puntos de control inmunológico como PD-1 para prevenir el agotamiento celular. Asimismo, se explora su uso en la degradación dirigida de genomas virales oncogénicos, como el virus del papiloma humano (VPH) y el virus de la hepatitis B (VHB), con el objetivo de reducir la incidencia de cánceres asociados (47). No obstante, el uso de nucleasas Cas9 presenta limitaciones relacionadas con la activación de *p53* y la inmunogenicidad de origen bacteriano, lo que ha impulsado el desarrollo de alternativas como el *base editing* y el *prime editing*, con perfiles de seguridad mejorados.

Más allá de la terapia, CRISPR ha emergido como una herramienta poderosa en el diagnóstico molecular. Las proteínas

Cas12 y Cas13, gracias a su actividad de corte colateral (*trans-cleavage*), permiten la detección ultrasensible de biomarcadores, incluyendo ADN tumoral en biopsias líquidas, alcanzando niveles de sensibilidad femtomolar y ofreciendo ventajas en rapidez frente a técnicas convencionales como la PCR. En este contexto, plataformas como SHERLOCK y DETECTR han demostrado gran potencial para la identificación rápida de patógenos y biomarcadores clínicos (48).

En el campo de las enfermedades infecciosas, CRISPR también ha mostrado aplicaciones prometedoras tanto en diagnóstico como en terapia. Estrategias basadas en bacteriófagos modificados permiten la entrega dirigida de sistemas CRISPR para inactivar genes de resistencia

antibiótica en bacterias patógenas, preservando al mismo tiempo la microbiota comensal (49).

Finalmente, la edición genómica ha abierto nuevas perspectivas en el tratamiento de enfermedades no infecciosas. En el ámbito cardiovascular, se ha propuesto el concepto de “vacunación genética”, donde la administración de editores de bases mediante nanopartículas lipídicas permite el silenciamiento permanente de genes como *PCSK9*, reduciendo los niveles de colesterol LDL (50). En enfermedades metabólicas, se exploran estrategias como el uso de CRISPR para inducir la transdiferenciación de tejido adiposo blanco en marrón, así como la corrección de errores innatos del metabolismo, incluyendo la fenilcetonuria,

restaurando la homeostasis sistémica con alta precisión (51).

Aplicaciones de CRISPR en Biotecnología Industrial y Sintética

La tecnología CRISPR-Cas ha transformado profundamente la biotecnología industrial al permitir la edición precisa de microorganismos para la producción de compuestos de alto valor agregado. El desarrollo de "fábricas de células microbianas" capaces de producir combustibles, químicos y fármacos representa un modelo de producción limpio y renovable que busca reemplazar los métodos dependientes del petróleo (52). En bacterias, levaduras y microalgas, CRISPR facilita la optimización de rutas metabólicas

mediante modificaciones multiplex simultáneas, acelerando significativamente el desarrollo de cepas industriales en comparación con los métodos de mutagénesis tradicionales (53,54).

Más allá de la edición permanente del genoma, la implementación de la interferencia CRISPR (CRISPRi) —que utiliza una versión catalíticamente inactiva de la proteína Cas9 (dCas9) — y la activación génica (CRISPRa) han ampliado el control dinámico en organismos industriales. Estas técnicas permiten la regulación fina, reversible y no disruptiva de la expresión génica, lo cual es crítico para equilibrar flujos metabólicos y aumentar los títulos de producción (55,56). En particular, se ha descrito el uso de CRISPRi en el organismo modelo *E. coli* para redirigir flujos hacia la

síntesis de productos como terpenos, polihidroxibutirato (PHB), n-butanol y 1,4-butanodiol, permitiendo además el estudio de genes esenciales que no podrían ser eliminados mediante *knockout* tradicional (57-59).

En el ámbito de la biología sintética, la integración de CRISPR ha facilitado la construcción de circuitos genéticos programables que responden a estímulos ambientales. Esta capacidad de control dinámico abre nuevas oportunidades en el diseño de microorganismos inteligentes para la biorremediación, el desarrollo de biosensores y la producción sostenible (60,61). En conjunto, estas herramientas posicionan a la ingeniería de sistemas vivos como el eje fundamental de la transición

hacia una bioeconomía global más adaptable y eficiente.

Aplicaciones de CRISPR en la Agricultura y Mejoramiento Genético Vegetal.

En un escenario global caracterizado por el cambio climático y el aumento sostenido de la demanda de alimentos, la biotecnología vegetal ha adquirido un papel estratégico en el fortalecimiento de la sostenibilidad y resiliencia de los sistemas agrícolas (62-64). En este contexto, la tecnología CRISPR-Cas se posiciona como una herramienta innovadora que permite la modificación precisa de genomas vegetales, superando en rapidez y exactitud a los enfoques tradicionales de fitomejoramiento (65). Aunque inicialmente fue aplicada en especies modelo como *Arabidopsis thaliana*

y tabaco, su adopción se ha expandido rápidamente hacia cultivos de relevancia económica, incluyendo cereales, leguminosas y especies frutales y leñosas (66).

Entre sus aplicaciones más destacadas se encuentra la generación de resistencia a enfermedades mediante la desactivación de genes de susceptibilidad. Este enfoque ha permitido el desarrollo de variedades de cultivos como trigo y arroz con mayor tolerancia a patógenos de origen fúngico y bacteriano (67). Asimismo, CRISPR ha sido utilizado para optimizar características agronómicas fundamentales, tales como la arquitectura vegetal, el rendimiento productivo y la eficiencia en la absorción y utilización de nutrientes,

contribuyendo a mejorar la productividad en condiciones ambientales limitantes (66).

En cultivos perennes, particularmente en especies como los cítricos, la edición genómica representa una alternativa prometedora frente a enfermedades de difícil manejo. La modificación de genes relacionados con la susceptibilidad ha mostrado resultados alentadores en la generación de tolerancia a enfermedades bacterianas como el huanglongbing (HLB), una de las principales amenazas para la citricultura a nivel mundial (68).

Sin embargo, a pesar de la eficacia de CRISPR para inducir mutaciones a través de la vía NHEJ, la introducción de cambios genéticos precisos continúa siendo un reto

en plantas. La baja eficiencia de la vía HDR, especialmente en tejidos somáticos y en especies con ciclos de vida prolongados, limita la posibilidad de realizar inserciones específicas o reemplazos alélicos controlados (68). En este sentido, la incorporación de tecnologías emergentes como el *base editing* y el *prime editing* se perfila como una estrategia clave para superar estas limitaciones, facilitando un mejoramiento genético más preciso y adaptable a las demandas agrícolas actuales y futuras.

Perspectivas y Conclusiones

A poco más de una década de su reingeniería como herramienta biotecnológica, el sistema CRISPR-Cas ha trascendido su función original como

sistema inmune bacteriano para convertirse en el pilar de la genética moderna. La transición desde la nucleasa Cas9 convencional hacia sistemas de alta precisión como el *base* y *prime editing*, sumada a la integración de la inteligencia artificial para la predicción de resultados, está derribando las barreras de la especificidad y la seguridad biológica.

En el ámbito de la salud, el horizonte se expande hacia curas definitivas para enfermedades antes intratables; en la industria, hacia la consolidación de una bioeconomía sostenible; y en la agricultura, hacia la protección de la seguridad alimentaria global mediante el rescate de cultivos críticos. El desafío futuro no reside únicamente en la optimización técnica, sino en la resolución de los profundos dilemas

éticos que conlleva el poder de alterar el código de la vida. La posibilidad de realizar modificaciones permanentes en líneas germinales, el acceso equitativo a estas terapias costosas y la regulación de organismos editados en el medio ambiente exigen un consenso global urgente. En definitiva, la armonización de marcos regulatorios robustos con la innovación científica será el factor determinante para que estos avances se traduzcan en beneficios tangibles, seguros y éticamente responsables para la sociedad y la biodiversidad.

REFERENCIAS

1. Hille F, Charpentier E. CRISPR-Cas: biology, mechanisms and relevance. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2016;371(1707):20150496. doi: 10.1098/rstb.2015.0496.
2. Gao C. The future of CRISPR technologies in agriculture. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2018;19(5):275–276. doi: 10.1038/nrm.2018.2.
3. Donohoue P, Barrangou R, May A. Advances in Industrial Biotechnology Using CRISPR-Cas Systems. *Trends Biotechnol.* 2017;36(2):134–146. doi: 10.1016/j.tibtech.2017.07.007.
4. Kim S, Hupperetz C, Lim S, Kim CH. Genome editing of immune cells using CRISPR/Cas9. *BMB Rep.* 2021;54(1):59-69. doi: 10.5483/BMBRep.2021.54.1.245.
5. Yosef I, Goren MG, Qimron U. Proteins and DNA elements essential for microbial adaptive immunity. *Nature.* 2012;483(7390):469–471. doi: 10.1038/nature10851.
6. McGinn J, Marraffini LA. Molecular mechanisms of CRISPR–Cas spacer acquisition.

Nat Rev Microbiol. 2019;17(1):7–12. doi:
10.1038/s41579-018-0071-7.

Biol. 2014;21(6):528–534. doi:
10.1038/nsmb.2820.

7. Bondy-Denomy J, Pawluk A, Maxwell KL, Davidson AR. Bacteriophage genes that allow an escape from CRISPR-Cas immunity. *Nature*. 2013;493(7432):429–432. doi:
10.1038/nature11723.

11. Wang J, Li J, Zhao H, Sheng G, Wang M, Yin M, et al. Structural and Mechanistic Basis of PAM-Dependent Spacer Acquisition in CRISPR-Cas Systems. *Cell*. 2015;163(4):840–853. doi:
10.1016/j.cell.2015.10.008.

8. Hille F, Richter H, Wong SP, Bratovic M, Ressel S, Charpentier E. The Biology of CRISPR-Cas: Backward and Forward. *Cell*. 2018;172(6):1239–1259. doi:
10.1016/j.cell.2017.11.032.

12. Sternberg SH, Redding S, Jinek M, Greene EC, Doudna JA. DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9. *Nature*. 2014;507(7490):62–67. doi:
10.1038/nature13011.

9. Jackson SA, McKenzie RE, Fagerlund RD, Kieper SN, Fineran PC, Brouns SJJ. CRISPR-Cas: Adapting to change. *Science*. 2017;356(6333):eaal5056. doi:
10.1126/science.aal5056.

13. Marraffini LA, Sontheimer EJ. CRISPR interference limits horizontal gene transfer in staphylococci by targeting DNA. *Science*. 2008;322(5909):1843–1845. doi:
10.1126/science.1165771.

10. Nuñez JK, Kranzusch PJ, Noeske J, Wright AV, Davies CW, Doudna JA. Cas1-Cas2 complex formation mediates spacer acquisition during CRISPR-Cas adaptive immunity. *Nat Struct Mol*

14. Amitai G, Sorek R. CRISPR–Cas adaptation: insights into the mechanism of action. *Nat Rev Microbiol*. 2016;14(2):67–76. doi:
10.1038/nrmicro.2015.14.

15. Deltcheva E, Chylinski K, Sharma CM, Gonzales K, Chao Y, Pirzada ZA, et al. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature*. 2011;471(7340):602–607. doi: 10.1038/nature09886.
16. Wu X, Kriz AJ, Sharp PA. Target specificity of the CRISPR-Cas9 system. *Quant Biol*. 2014;2(2):59–70. doi: 10.1007/s40484-014-0030-x.
17. Bondy-Denomy J, Qian J, Westra E, et al. Prophages mediate defense against phage infection through diverse mechanisms. *ISME J*. 2016;10(12):2854–2866. doi: 10.1038/ismej.2016.79.
18. Pawluk A, Amrani N, Zhang Y, Garcia B, Hidalgo-Reyes Y, Lee J, et al. Naturally Occurring Off-Switches for CRISPR-Cas9. *Cell*. 2016;167(7):1829-1838.e9. doi: 10.1016/j.cell.2016.11.017.
19. Gaj T, Gersbach CA, Barbas CF 3rd. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends Biotechnol*. 2013;31(7):397-405. doi: 10.1016/j.tibtech.2013.04.004.
20. 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(6096):816-21. doi: 10.1126/science.1225829.
21. Jiang F, Doudna JA. CRISPR-Cas9 Structures and Mechanisms. *Annu Rev Biophys*. 2017;46:505-29. doi: 10.1146/annurev-biophys-062215-010822.
22. Liao H, Wu J, VanDusen NJ, Li Y, Zheng Y. CRISPR-Cas9-mediated homology-directed repair for precise gene editing. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2024;35(4):102344. doi: 10.1016/j.omtn.2024.102344.

23. Yang H, Ren S, Yu S, Pan H, Li T, et al. Methods Favoring Homology-Directed Repair Choice in Response to CRISPR/Cas9 Induced-Double Strand Breaks. *Int J Mol Sci*. 2020;21(18):6461. doi: 10.3390/ijms21186461.

24. Makarova KS, Wolf YI, Koonin EV. The basic building blocks and evolution of CRISPR-CAS systems. *Biochem Soc Trans*. 2013;41(6):1392–1400. doi: 10.1042/BST20130038.

25. 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(11):722–736. doi: 10.1038/nrmicro3569.

26. Shmakov S, Abudayyeh OO, Makarova KS, Wolf YI, Gootenberg JS, Semenova E, et al. Discovery and Functional Characterization of Diverse Class 2 CRISPR-Cas Systems. *Mol Cell*. 2015;60(3):385–397. doi: 10.1016/j.molcel.2015.10.008.

27. Zetsche B, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Slaymaker IM, Makarova KS, Essletzbichler P, et al. Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system. *Cell*. 2015;163(3):759–71. doi: 10.1016/j.cell.2015.09.038.

28. Abudayyeh OO, Gootenberg JS, Konermann S, Ding J, Slaymaker IM, Lantosca WE, et al. C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting effector. *Science*. 2016;353(6299):aaf5573. doi: 10.1126/science.aaf5573.

29. Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Lee JW, Essletzbichler P, Dy AJ, Joung J, et al. Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2. *Science*. 2017;356(6336):438–442. doi: 10.1126/science.aam9321.

30. Kalter N, Fuster-García C, Silva A, Ronco-Díaz V, Roncelli S, Turchiano G, et al. Off-target effects in CRISPR-Cas genome editing for human therapeutics: Progress and challenges. *Mol Ther*

- Nucleic Acids. 2025;36(3):102636. doi: 10.1016/j.omtn.2025.102636.
31. Lin Y, Cradick TJ, Brown MT, Deshmukh H, Ranjan P, Sarode N, et al. CRISPR/Cas9 systems have off-target activity with insertions or deletions between target DNA and guide RNA sequences. *Nucleic Acids Res.* 2014;42(11):7473–7485. doi: 10.1093/nar/gku402.
32. 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(9):822-6. doi: 10.1038/nbt.2623.
33. Tsai SQ, Joung JK. Defining and improving the genome-wide specificities of CRISPR-Cas9 nucleases. *Nat Rev Genet.* 2016;17(5):300-12. doi: 10.1038/nrg.2016.28.
34. Hsu PD, Lander ES, Zhang F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell.* 2014;157(6):1262–1278. doi: 10.1016/j.cell.2014.05.010.
35. Komor AC, Badran AH, Liu DR. CRISPR-based technologies for the manipulation of eukaryotic genomes. *Cell.* 2017;168(1-2):20–36. doi: 10.1016/j.cell.2016.10.044.
36. Lino CA, Harper JC, Carney JP, Timlin JA. Delivering CRISPR: a review of the challenges and approaches. *Drug Deliv.* 2018;25(1):1234–1257. doi: 10.1080/10717544.2018.1474964.
37. Wang H, La Russa M, Qi LS. CRISPR/Cas9 in genome editing and beyond. *Annu Rev Biochem.* 2016;85:227–264. doi: 10.1146/annurev-biochem-060815-014607.
38. Charlesworth CT, Deshpande PS, Dever DP, Camarena J, Lemgart VT, Cromer MK, et al. Identification of preexisting adaptive immunity to Cas9 proteins in humans. *Nat Med.*

2019;25(2):249-254. doi: 10.1038/s41591-018-0326-x.

39. Komor AC, Kim YB, Packer MS, Zuris JA, Liu DR. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature*. 2016;533(7603):420–424. doi: 10.1038/nature17946.

40. Gaudelli NM, Komor AC, Rees HA, Packer MS, Badran AH, Bryson DI, et al. Programmable base editing of A•T to G•C in genomic DNA without DNA cleavage. *Nature*. 2017;551(7681):464–471. doi: 10.1038/nature24644.

41. Anzalone AV, Randolph PB, Davis JR, Sousa AA, Koblan LW, Levy JM, et al. Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. *Nature*. 2019;576(7785):149–157. doi: 10.1038/s41586-019-1711-4.

42. Kaya HB. Base Editing and Prime Editing. In: Riccroch A, et al., editors. *A Roadmap for Plant*

Genome Editing. Cham: Springer; 2024. p. 25–45. doi: 10.1007/978-3-031-46150-7_2.

43. Zhang B. CRISPR/Cas Gene Therapy. *J Cell Physiol*. 2021;236(4):2459–2481. doi: 10.1002/jcp.30064.

44. Pont M, Marqués M, Sorolla MA, Parisi E, Urdanibia I, Morales S, et al. Applications of CRISPR Technology to Breast Cancer and Triple Negative Breast Cancer Research. *Cancers*. 2023;15(17):4364. doi: 10.3390/cancers15174364.

45. Kim MG, Go MJ, Kang SH, Jeong SH, Lim K. Revolutionizing CRISPR technology with artificial intelligence. *Exp Mol Med*. 2025;57. doi: 10.1038/s12276-025-01462-9.

46. Katti A, Diaz BJ, Caragine CM, et al. CRISPR in cancer biology and therapy. *Nat Rev Cancer*. 2022;22(5):259–279. doi: 10.1038/s41568-022-00441-w.

47. Stefanoudakis D, Kathuria-Prakash N, Sun AW, Abel M, Drolen CE, et al. The Potential Revolution of Cancer Treatment with CRISPR Technology. *Cancers*. 2023;15(6):1813. doi: 10.3390/cancers15061813.
48. Wang M, Chen M, Wu X, Huang X, Yu B. CRISPR applications in cancer diagnosis and treatment. *Cell Mol Biol Lett*. 2023;28(1):73. doi: 10.1186/s11658-023-00483-4.
49. Strich JR, Chertow DS. CRISPR-Cas Biology and Its Application to Infectious Diseases. *J Clin Microbiol*. 2019;57(4):e01307-18. doi: 10.1128/jcm.01307-18.
50. Musunuru K. CRISPR and cardiovascular diseases. *Cardiovasc Res*. 2023;119(1):79–93. doi: 10.1093/cvr/cvac048.
51. Arora Y, Priya, Kumar M, Kumar D. Current approaches in CRISPR-Cas system for metabolic disorder. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2024;204:1–32. doi: 10.1016/bs.pmbts.2024.03.001.
52. Ding W, Zhang Y, Shi S. Development and Application of CRISPR/Cas in Microbial Biotechnology. *Front Bioeng Biotechnol*. 2020;8:711. doi: 10.3389/fbioe.2020.00711.
53. Jakociunas T, Bonde I, Herrgård M, Harrison SJ, Kristensen M, Pedersen LE, et al. Multiplex metabolic pathway engineering using CRISPR/Cas9 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metab Eng*. 2015;28:213-222. doi: 10.1016/j.ymben.2015.01.008.
54. Nielsen J, Keasling JD. Engineering Cellular Metabolism. *Cell*. 2016;164(6):1185-1197. doi: 10.1016/j.cell.2016.02.004.
55. Qi LS, Larson MH, Gilbert LA, Doudna JA, et al. Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. *Cell*. 2013;152(5):1173–1183. doi: 10.1016/j.cell.2013.02.022.

56. Schultenkämper K, Brito LF, Wendisch VF. Impact of CRISPR interference on strain development in biotechnology. *Biotechnol Appl Biochem*. 2020;67(1):7–21. doi: 10.1002/bab.1901.
57. Kim SK, Seong W, Han GH, Lee DH, Lee SG. CRISPR interference-guided multiplex repression of endogenous competing pathway genes for redirecting metabolic flux in *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact*. 2017;16(1):188. doi: 10.1186/s12934-017-0802-x.
58. Meng DC, Chen GQ. Synthetic Biology of Polyhydroxyalkanoates (PHA). *Adv Biochem Eng Biotechnol*. 2018;162:147–174. doi: 10.1007/10_2017_3.
59. Wu MY, Sung LY, Li H, Huang CH, Hu YC. Combining CRISPR and CRISPRi Systems for Metabolic Engineering of *E. coli* and 1,4-BDO Biosynthesis. *ACS Synth Biol*. 2017;6(12):2350–2361. doi: 10.1021/acssynbio.7b00251.
60. Liu Y, Wan X, Wang B. Engineered CRISPRa enables programmable eukaryote-like gene activation in bacteria. *Nat Commun*. 2017;8:15113. doi: 10.1038/ncomms15113.
61. Nielsen J, Keasling JD. Engineering cellular metabolism. *Cell*. 2016;164(6):1185–1197. doi: 10.1016/j.cell.2016.02.004.
62. Gan WC, Ling APK. CRISPR/Cas9 in plant biotechnology: applications and challenges. *BioTechnologia*. 2022;103(1):81–93. doi: 10.5114/bta.2022.113919.
63. Zhu H, Li C, Gao C. Applications of CRISPR-Cas in agriculture and plant biotechnology. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2020;21(11):661–677. doi: 10.1038/s41580-020-00288-9.
64. Pixley KV, Falck-Zepeda JB, Giller KE, Glenna LL, Gould F, et al. Genome Editing, Gene Drives, and Synthetic Biology: Will They Contribute to Disease-Resistant Crops, and Who Will Benefit? *Annu Rev Phytopathol*. 2019;57:165–188. doi: 10.1146/annurev-phyto-080417-045954.

2019;13(5):501–510. doi: 10.1007/s11816-019-00556-x.

65. Hamdan MF, Karlson CKS, Teoh EY, Lau SE, Tan BC. Genome Editing for Sustainable Crop Improvement and Mitigation of Biotic and Abiotic Stresses. *Plants*. 2022;11(19):2625. doi: 10.3390/plants11192625.

66. Haider S, Singh AP, Panthi B, Sindhu SR, Safa NT, et al. Advances in CRISPR/Cas9 genome editing for crop improvement and global food security. *Curr Plant Biol*. 2026;46:100593. doi: 10.1016/j.cpb.2026.100593.

67. Oliva R, Ji C, Atienza-Grande G, Huguet-Tapia JC, Perez-Quintero A, et al. Broad-spectrum resistance to bacterial blight in rice using genome editing. *Nat Biotechnol*. 2019;37(11):1344–1350. doi: 10.1038/s41587-019-0267-z.

68. Wang L, Chen S, Peng A, Xie Z, He Y, Zou X. CRISPR/Cas9-mediated editing of CsWRKY22 reduces susceptibility to *Xanthomonas citri* subsp. *citri* in Wanjincheng orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck). *Plant Biotechnol Rep*.