

Avances en la modulación y edición genómica mediada por CRISPR-Cas: Mecanismos, vehículos de entrega y barreras biológicas

Advances in CRISPR-Cas-mediated genomic modulation and editing: Mechanisms, delivery vehicles, and biological barriers

Gabriela Salomé Morales Ramos*

Profesional Independiente
Ambato - Ecuador
gabriela.morales.pro@gmail.com
<https://orcid.org/0009-0005-4608-2202>

***Correspondencia:**
gabriela.morales.pro@gmail.com

Cómo citar este artículo:

Morales, G. (2026). Avances en la modulación y edición genómica mediada por CRISPR-Cas: Mecanismos, vehículos de entrega y barreras biológicas. *Esprint Investigación*, 5(2), 243-268.
<https://doi.org/10.61347/ei.v5i2.365>

Recibido: 17 de julio de 2026

Aceptado: 21 de agosto de 2026

Publicado: 1 de septiembre de 2026

Resumen: Las plataformas CRISPR-Cas han transformado la edición genómica y la regulación epigenética debido a su elevada versatilidad y capacidad de programación molecular. El objetivo de esta revisión fue analizar integralmente los fundamentos moleculares del sistema CRISPR-Cas, sus principales variantes de precisión, los mecanismos de entrega y las limitaciones que condicionan su aplicación terapéutica. Se examinaron herramientas avanzadas como los editores de bases y la edición primaria, orientadas a reducir los riesgos asociados con las roturas de doble cadena y mejorar la precisión de las modificaciones genéticas. Además, se evaluaron los sistemas de administración físicos, virales y no virales, considerando sus ventajas y restricciones relacionadas con la eficiencia de transferencia, especificidad tisular, actividad fuera del objetivo (*off-target*) e inmunogenicidad. Los resultados evidencian que, aunque estas tecnologías han ampliado significativamente las posibilidades de la ingeniería genómica, su implementación clínica requiere optimizar la fidelidad de las nucleasas, desarrollar vehículos de entrega más seguros y controlar las respuestas inmunológicas del hospedador. La integración de estos avances será determinante para favorecer una transición segura desde la investigación experimental hacia aplicaciones biomédicas dirigidas al tratamiento de enfermedades genéticas, infecciosas y otras patologías de interés clínico.

Palabras clave: Bioseguridad, CRISPR-Cas9, edición genómica, efectos *off-target*, vectores de entrega.

Abstract: CRISPR-Cas platforms have transformed genome editing and epigenetic regulation due to their high versatility and molecular programmability. The objective of this review was to comprehensively analyze the molecular foundations of the CRISPR-Cas system, its main precision-engineering variants, delivery mechanisms, and the limitations that constrain its therapeutic application. Advanced tools such as base editors and Prime Editing were examined as strategies aimed at reducing risks associated with double-strand DNA breaks and improving the accuracy of genetic modifications. In addition, physical, viral, and non-viral delivery systems were evaluated, considering their advantages and limitations related to transfer efficiency, tissue specificity, off-target activity, and immunogenicity. The findings indicate that, although these technologies have significantly expanded the possibilities of genome engineering, their clinical implementation requires optimization of nuclease fidelity, development of safer delivery vehicles, and control of host immune responses. The integration of these advances will be essential to promote a safe transition from experimental research toward biomedical applications aimed at treating genetic, infectious, and other clinically relevant diseases.

Keywords: Biosafety, CRISPR-Cas9, delivery vectors, genome editing, off-target effects.

Copyright: Derechos de autor 2026 Gabriela Salomé Morales Ramos.



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

1. Introducción

La ingeniería genómica evolucionó desde las primeras plataformas de edición, como las meganucleasas, nucleasas de dedos de zinc (ZFNs) y nucleasas efectoras similares a activadores de transcripción (TALENs), cuya aplicación estuvo limitada por la complejidad del diseño de dominios proteicos específicos para el reconocimiento del ADN (Laurent et al., 2024; Li et al., 2021). Las secuencias CRISPR fueron identificadas inicialmente en 1987 en *Escherichia coli* y posteriormente caracterizadas como un sistema de inmunidad adaptativa procariota basado en nucleasas Cas y ARN guía (El Ouar, 2021; Nidhi et al., 2021). La incorporación del ARN guía sintético (sgRNA) en 2012 permitió reemplazar el reconocimiento proteína-ADN por complementariedad Watson-Crick, favoreciendo la precisión y multiplexación de la edición genética (El Ouar, 2021; Li et al., 2021; Li et al., 2023).

El desarrollo de nuevas variantes como la edición de bases, Prime Editing, CRISPR de interferencia (CRISPRi), activación transcripcional (CRISPRa) y modificaciones epigenéticas amplió las aplicaciones potenciales del sistema CRISPR-Cas en investigación biomédica y terapéutica (Lafi et al., 2025; Tyumentseva et al., 2023). Sin embargo, su aplicación clínica continúa limitada por desafíos relacionados con la seguridad, especificidad y eficiencia del proceso de edición. Entre los principales riesgos destacan los efectos fuera del objetivo (*off-target*), rearrreglos cromosómicos, citotoxicidad asociada con la vía p53 e inmunogenicidad frente a las proteínas Cas de origen bacteriano (Prasad et al., 2021; Sharma et al., 2021; Zhang et al., 2021).

Además de los desafíos asociados con la edición molecular, la administración eficiente de los componentes CRISPR-Cas constituye una barrera crítica para su implementación clínica. Los vectores virales presentan elevada capacidad de transferencia, pero pueden generar respuestas inmunológicas, limitaciones de carga genética y riesgos relacionados con la integración genómica. Por otra parte, los sistemas no virales ofrecen mayor seguridad y versatilidad, aunque enfrentan dificultades relacionadas con la estabilidad del complejo, el escape endosómico y la distribución específica hacia tejidos diana (Du et al., 2023; Sharma et al., 2021).

En este contexto, el presente artículo tiene como objetivo analizar los fundamentos moleculares del sistema CRISPR-Cas y sus principales variantes de edición de precisión, además de examinar las estrategias actuales de administración mediante sistemas físicos, virales y no virales. Asimismo, se evalúan las principales limitaciones asociadas con la genotoxicidad, inmunogenicidad y eficiencia de entrega, con la finalidad de identificar los avances tecnológicos orientados a mejorar la seguridad y aplicabilidad clínica de estas herramientas de ingeniería genómica.

2. Metodología

El presente estudio se desarrolló mediante una revisión narrativa de la literatura con enfoque documental, analítico y crítico, orientada a examinar integralmente las bases moleculares, los sistemas de transferencia y los desafíos de bioseguridad asociados al sistema CRISPR-Cas y sus tecnologías derivadas. La búsqueda bibliográfica se realizó entre febrero y junio de 2026 en las bases de datos internacionales PubMed, Scopus, Web of Science y Google Scholar. Para la recuperación de información se emplearon descriptores MeSH/DeCS y términos libres combinados mediante operadores booleanos AND y OR, incluyendo estrategias como: ("CRISPR-Cas" OR "genome editing") AND ("off-target effects" OR "biosafety" OR "genotoxicity").

La búsqueda se limitó a publicaciones disponibles en idioma inglés y español, priorizando artículos originales, revisiones sistemáticas y metaanálisis publicados entre 2020 y 2026, sin excluir estudios

previos considerados relevantes por su contribución histórica o conceptual. La selección de la evidencia se efectuó mediante criterios cualitativos relacionados con pertinencia temática, calidad metodológica y aporte científico al análisis de los mecanismos moleculares, aplicaciones y limitaciones del sistema CRISPR-Cas.

El proceso de selección bibliográfica se estructuró en tres fases consecutivas: primero, se eliminaron registros duplicados y estudios que no guardaban relación con el objetivo de investigación; posteriormente, se realizó la revisión de títulos y resúmenes para descartar publicaciones sin enfoque específico en edición genómica, mecanismos moleculares o sistemas de entrega; finalmente, se efectuó una lectura crítica a texto completo de los estudios potencialmente elegibles. La información seleccionada se organizó mediante categorías temáticas y se analizó de manera cualitativa para integrar los principales avances y desafíos del sistema CRISPR-Cas.

3. Resultados

Mecanismo general y estructura de los sistemas CRISPR-Cas

Fases del mecanismo inmunitario general

Los sistemas CRISPR-Cas constituyen mecanismos de inmunidad adaptativa presentes en bacterias y arqueas, caracterizados por reconocer secuencias genéticas específicas y eliminar material genético invasor proveniente de plásmidos y bacteriófagos (Navarro et al., 2025; El Ouar, 2021). Aunque presentan una organización funcional conservada, las proteínas Cas involucradas y los mecanismos moleculares específicos pueden variar significativamente entre diferentes microorganismos (Navarro et al., 2025). De manera general, este proceso inmunitario se desarrolla mediante tres etapas consecutivas relacionadas con la adquisición de espaciadores, la expresión del crRNA y la interferencia con los ácidos nucleicos invasores (Navarro et al., 2025; El Ouar, 2021; Nidhi et al., 2021).

La figura 1 representa la primera etapa del mecanismo inmunitario CRISPR-Cas: la fase de adaptación o adquisición de espaciadores, mediante la cual las bacterias incorporan fragmentos de ADN provenientes de elementos genéticos invasores, como bacteriófagos, para generar memoria inmunológica frente a futuras infecciones. Durante esta fase, el material genético del bacteriófago ingresa en la célula bacteriana y una región específica denominada protoespaciador es reconocida junto con su motivo adyacente al protoespaciador (PAM). Posteriormente, el complejo formado principalmente por las proteínas Cas1 y Cas2 captura e integra este fragmento de ADN exógeno dentro del locus CRISPR del hospedador, generando un nuevo espaciador dentro de la matriz CRISPR.

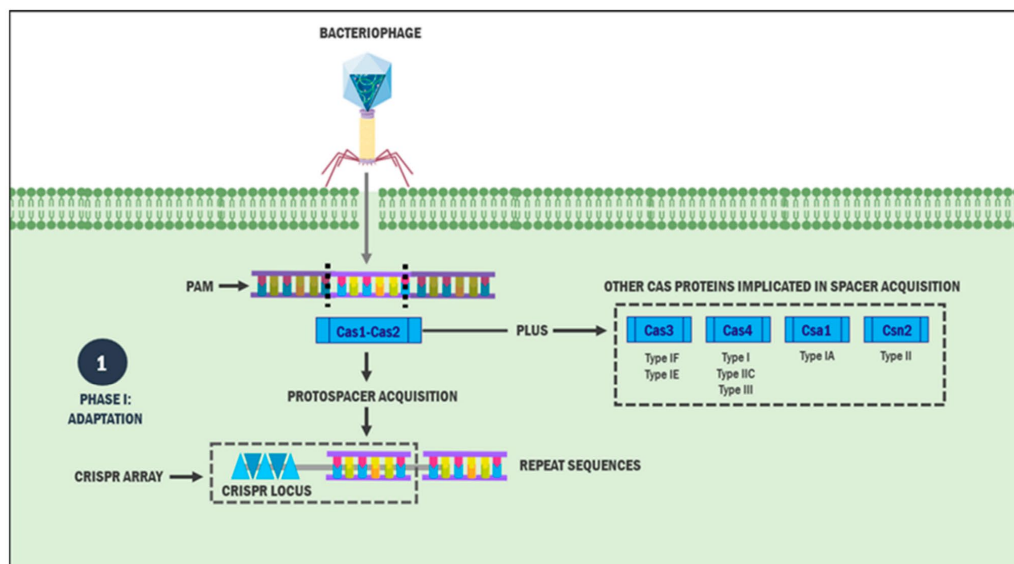
La incorporación del espaciador ocurre en una región próxima a la secuencia líder del locus CRISPR, donde queda almacenada la información genética correspondiente al agente invasor. Esta nueva secuencia se integra entre repeticiones directas del arreglo CRISPR, formando parte del sistema de memoria adaptativa bacteriana. Además de Cas1 y Cas2, la figura muestra la participación de otras proteínas asociadas al proceso de adquisición de espaciadores, incluyendo Cas3, Cas4 y proteínas relacionadas con sistemas específicos de Tipo I, Tipo II y Tipo III, las cuales pueden intervenir en el procesamiento, selección o integración del material genético invasor dependiendo de la clasificación del sistema CRISPR-Cas.

En conjunto, esta etapa permite que la bacteria conserve una huella genética del agente infeccioso previamente encontrado, lo que posibilita que en exposiciones posteriores el sistema CRISPR-Cas

reconozca de manera específica la secuencia invasora y active las fases posteriores de expresión del crRNA e interferencia.

Figura 1

Fase de Adaptación en los sistemas CRISPR-Cas



Nota. Adaptado de Navarro et al. (2025).

La figura 2 representa las etapas posteriores a la adquisición de espaciadores dentro del mecanismo inmunitario CRISPR-Cas, correspondientes a la biogénesis del crRNA y la fase de interferencia. Estas etapas permiten transformar la información almacenada en el locus CRISPR en moléculas guía capaces de dirigir las proteínas Cas hacia secuencias específicas de ácidos nucleicos invasores. Durante la fase de biogénesis del crRNA, el locus CRISPR formado por repeticiones directas y espaciadores adquiridos es transcrito para generar una molécula precursora denominada pre-crRNA. Este ARN precursor posteriormente es procesado por diferentes complejos enzimáticos dependiendo del tipo de sistema CRISPR-Cas. En los sistemas de Clase 1 participan complejos multiproteicos, mientras que los sistemas de Clase 2 emplean proteínas efectoras individuales con mecanismos de procesamiento específicos.

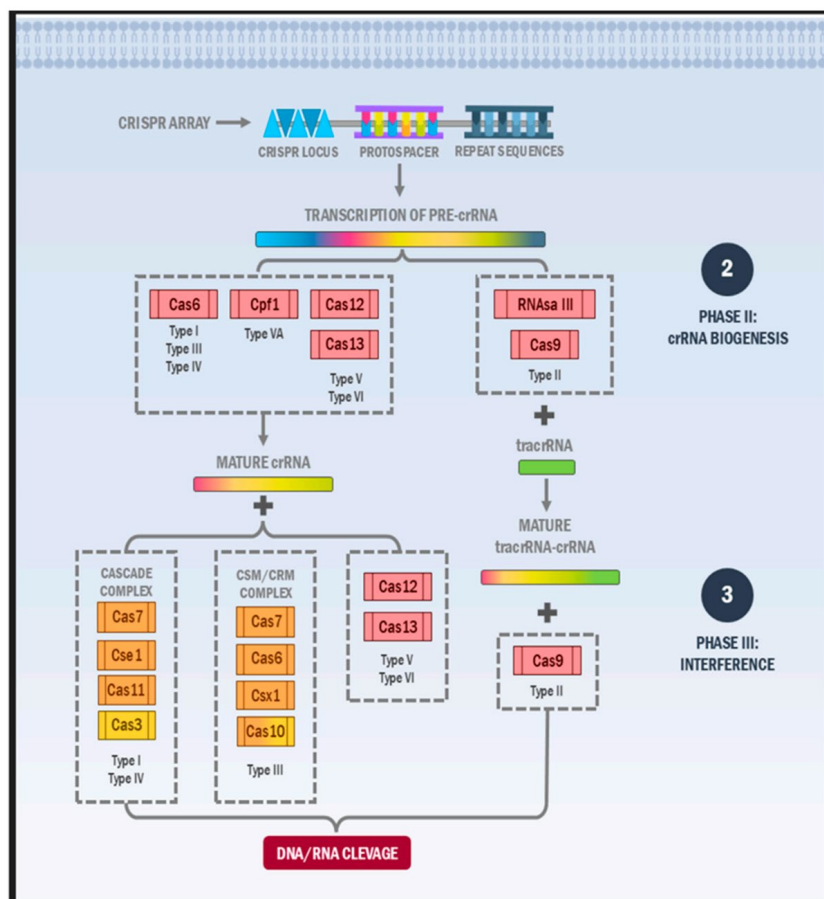
La figura muestra que en los sistemas de Clase 1, enzimas como Cas6 participan en el procesamiento del pre-crRNA para generar moléculas maduras de crRNA. Estos crRNA pueden asociarse posteriormente con complejos efectores como Cascade en sistemas Tipo I o complejos Csm/Cmr en sistemas Tipo III, formando estructuras capaces de reconocer secuencias complementarias del material genético invasor. En los sistemas de Clase 2, particularmente el Tipo II, la maduración del crRNA depende de la participación de RNasa III, Cas9 y tracrRNA, elementos que permiten la formación del complejo funcional tracrRNA-crRNA. Este complejo posteriormente se une a Cas9, generando una plataforma programable capaz de reconocer y modificar secuencias específicas de ADN mediante complementariedad de bases.

La fase de interferencia constituye el mecanismo efector final del sistema CRISPR-Cas. En esta etapa, los complejos formados por crRNA y proteínas Cas identifican las secuencias diana mediante el reconocimiento de regiones complementarias. Una vez establecida la interacción molecular, las nucleasas ejecutan la degradación del material genético invasor mediante cortes específicos en ADN o ARN, dependiendo del tipo de sistema involucrado. En conjunto, la figura evidencia la diversidad estructural y funcional de los sistemas CRISPR-Cas, mostrando que, aunque las diferentes clases

utilizan proteínas y complejos efectores distintos, todas comparten un principio común: la generación de moléculas guía derivadas del crRNA y su utilización para reconocer y eliminar ácidos nucleicos específicos.

Figura 2

Fases de Biogénesis e Interferencia en los sistemas CRISPR-Cas



Nota. Adaptado de Navarro et al., (2025).

Adaptación o adquisición de espaciadores.

La fase de adaptación constituye el primer mecanismo de memoria inmunológica del sistema CRISPR-Cas y consiste en la captura e incorporación de fragmentos cortos de ADN provenientes de elementos genéticos móviles invasores (MGE, por sus siglas en inglés) dentro del locus CRISPR del hospedador, en una región cercana a la secuencia líder (Navarro et al., 2025; El Ouar, 2021; Nidhi et al., 2021). Estos fragmentos incorporados reciben el nombre de espaciadores y presentan generalmente una longitud aproximada entre 30 y 50 pares de bases (Navarro et al., 2025).

La selección del fragmento de ADN invasor o proto espaciador no ocurre de manera aleatoria, sino que depende de la presencia de motivos adyacentes al proto espaciador (PAM), secuencias cortas de 2 a 5 nucleótidos esenciales para diferenciar el material genético extraño del propio genoma bacteriano (Navarro et al., 2025). Aunque los mecanismos exactos de integración aún no se comprenden completamente, esta etapa es ejecutada principalmente por las nucleasas dependientes de metales Cas1 y Cas2, las cuales forman un complejo proteico encargado de incorporar el nuevo espaciador en la región CRISPR (Navarro et al., 2025; Nidhi et al., 2021).

Los mecanismos de adquisición presentan variaciones según el tipo de sistema CRISPR-Cas. En los sistemas pertenecientes al Tipo I participa el factor de integración IHF, cuya función es favorecer la flexión del ADN durante la incorporación del espaciador, mientras que los sistemas de Tipo II emplean mecanismos mediados por Cas1 asociados con secuencias específicas de reconocimiento molecular (Nidhi et al., 2021).

Expresión y biogénesis del crRNA

Después de la incorporación del nuevo espaciador en el locus CRISPR, se inicia la transcripción de las secuencias repetidas y los espaciadores previamente adquiridos, generando un ARN precursor denominado pre-crRNA (Navarro et al., 2025; El Ouar, 2021; Nidhi et al., 2021). Posteriormente, este precursor es procesado mediante ribonucleasas específicas que reconocen las regiones repetidas y producen moléculas maduras de crRNA capaces de dirigir la respuesta inmunitaria frente al material genético invasor (Navarro et al., 2025; El Ouar, 2021; Nidhi et al., 2021).

Dependiendo del sistema CRISPR-Cas, los crRNA maduros pueden experimentar modificaciones adicionales en sus extremos 5' o 3', necesarias para mejorar su estabilidad y favorecer su interacción con los complejos efectores correspondientes (Nidhi et al., 2021). La maquinaria molecular implicada en esta etapa varía según la clasificación del sistema; los sistemas de Clase 1 emplean complejos multiproteicos como Cascade, Csm y Cmr, mientras que los sistemas de Clase 2 utilizan proteínas efectoras individuales como Cas9, Cas12a y Cas13 (Navarro et al., 2025).

Interferencia

La fase de interferencia representa la etapa final del mecanismo CRISPR-Cas y comprende el reconocimiento y eliminación del material genético invasor mediante complejos efectores específicos (Nidhi et al., 2021). En esta etapa, los fragmentos maduros de crRNA actúan como moléculas guía que dirigen las proteínas Cas hacia secuencias complementarias del material genético objetivo mediante mecanismos de apareamiento de bases (El Ouar, 2021; Navarro et al., 2025; Nidhi et al., 2021).

Una vez establecida la interacción entre el complejo crRNA-Cas y la secuencia diana, las nucleasas producen la degradación del ácido nucleico invasor, evitando su propagación dentro del microorganismo hospedador (El Ouar, 2021; Navarro et al., 2025). La arquitectura del complejo efector y los mecanismos empleados para evitar la autodegradación varían entre los diferentes sistemas CRISPR-Cas, dependiendo de la clase y tipo involucrado (Navarro et al., 2025; Nidhi et al., 2021).

En algunos sistemas, como los Tipos I, II, IV y V, el reconocimiento del material genético depende de la presencia del motivo PAM en la secuencia objetivo, mientras que otros sistemas utilizan mecanismos alternativos de discriminación mediante características específicas del crRNA o regiones flanqueantes del ARN objetivo (Navarro et al., 2025; Nidhi et al., 2021).

Arquitectura del locus CRISPR y componentes proteicos (Cas)

Un locus CRISPR convencional está constituido por tres elementos fundamentales: la matriz CRISPR, la secuencia líder y los genes asociados a CRISPR (*cas*) (Nidhi et al., 2021). La matriz CRISPR está formada por secuencias repetidas directas intercaladas con espaciadores adquiridos durante encuentros previos con elementos genéticos invasores, funcionando como un sistema de memoria

inmunológica. Por su parte, la secuencia líder corresponde a una región reguladora que participa en la transcripción y adquisición de nuevos espaciadores, mientras que los genes *cas* codifican las proteínas responsables del procesamiento y la interferencia (Nidhi et al., 2021).

Dentro de la familia de genes *cas* se han identificado aproximadamente 45 genes asociados con diferentes funciones dentro del mecanismo CRISPR-Cas. Entre ellos, Cas1 y Cas2 constituyen proteínas conservadas responsables de la captura e integración de nuevos espaciadores, mientras que otras nucleasas actúan como componentes efectores encargados del reconocimiento y corte del material genético objetivo (El Ouar, 2021; Zhang et al., 2021).

La proteína Cas9, perteneciente al sistema de Tipo II, representa uno de los efectores más estudiados debido a su amplia aplicación en ingeniería genética. Esta endonucleasa guiada por ARN está constituida por un lóbulo de reconocimiento (REC) y un lóbulo catalítico que contiene los dominios HNH y RuvC, responsables del corte de las cadenas complementarias y no complementarias del ADN, respectivamente (El Ouar, 2021; Li et al., 2023; Zhang et al., 2021). La actividad de Cas9 genera roturas de doble cadena próximas al motivo PAM, específicamente a tres nucleótidos del sitio de reconocimiento 3'-NGG.

Las modificaciones estructurales de Cas9 han permitido desarrollar variantes con funciones específicas para aplicaciones avanzadas de edición genética. La variante nickasa (nCas9) presenta inactivación de uno de sus dominios catalíticos y produce cortes en una sola cadena del ADN, mientras que la Cas9 inactiva o "muerta" (dCas9) conserva la capacidad de unión específica al ADN, pero carece de actividad de corte, permitiendo su utilización en regulación transcripcional y edición epigenética (Akbar et al., 2025).

Además de Cas9, otros efectores han adquirido relevancia dentro de la ingeniería genómica, como Cpf1 o Cas12a, perteneciente al Tipo V del sistema CRISPR-Cas. Esta nucleasa, identificada en géneros como *Prevotella* y *Francisella*, carece del dominio HNH y utiliza dos dominios con actividad tipo RuvC para producir la escisión del ADN. Asimismo, reconoce motivos PAM ricos en timina, principalmente secuencias 5'-TTTN, diferenciándose de los mecanismos empleados por Cas9 (El Ouar, 2021).

Clasificación taxonómica de los sistemas CRISPR-Cas

La clasificación actual de los sistemas CRISPR-Cas se fundamenta en la organización estructural de los complejos efectores y en la divergencia evolutiva de las proteínas Cas. De acuerdo con esta clasificación, estos sistemas se agrupan en dos clases principales, seis tipos (I al VI) y múltiples subtipos definidos según características moleculares específicas (El Ouar, 2021; Nidhi et al., 2021).

La Clase 1 comprende los sistemas Tipo I, III y IV, los cuales representan aproximadamente el 90 % de los sistemas CRISPR-Cas identificados en bacterias y arqueas. Estos sistemas se caracterizan por utilizar complejos efectores multiproteicos encargados del procesamiento del crRNA y la degradación del material genético invasor (El Ouar, 2021; Liu et al., 2022; Zhang et al., 2021).

Dentro de esta clase, el Tipo I presenta genes relacionados con la adaptación, como *cas1* y *cas2*, además de componentes asociados con la formación del complejo efector, incluyendo *cas5*, *cas7* y *cas6*, encargado del procesamiento del pre-crRNA (El Ouar, 2021). Por otra parte, el Tipo III se caracteriza por la presencia del gen *cas10* y mecanismos de interferencia mediados por complejos asociados al reconocimiento del ARN objetivo (El Ouar, 2021). El Tipo IV presenta características particulares debido a la ausencia de matrices CRISPR y genes propios de adaptación, utilizando elementos derivados de otros loci o ARN exógenos para su funcionamiento (El Ouar, 2021).

La Clase 2 incluye los sistemas Tipo II, V y VI, los cuales representan aproximadamente el 10 % restante y se distinguen por utilizar proteínas efectoras individuales en lugar de complejos multiproteicos (El Ouar, 2021; Zhang et al., 2021). Esta característica ha favorecido su adaptación como herramientas biotecnológicas debido a su menor complejidad estructural y facilidad de programación.

El sistema Tipo II es el más empleado en aplicaciones de edición genética y utiliza la endonucleasa Cas9 junto con un ARN transactivador (tracrRNA) y la enzima RNasa III para la maduración del pre-crRNA (El Ouar, 2021). Por otro lado, los sistemas Tipo V y VI emplean efectores únicos como Cas12 y Cas13, especializados en el reconocimiento y procesamiento de ADN y ARN, respectivamente (El Ouar, 2021; Nidhi et al., 2021).

CRISPR-Cas como herramienta de edición génica

La edición genómica mediante CRISPR-Cas requiere la inducción de roturas de doble cadena (DSBs) en regiones específicas del genoma, las cuales posteriormente son reparadas mediante mecanismos celulares endógenos que determinan el resultado final de la modificación genética (Prasad et al., 2021). En comparación con plataformas previas como las nucleasas de dedos de zinc (ZFNs) y las nucleasas efectoras similares a activadores de transcripción (TALENs), el sistema CRISPR-Cas simplificó el proceso de reconocimiento molecular mediante la utilización de ARN guía capaz de dirigir la nucleasa hacia secuencias específicas del ADN (Prasad et al., 2021; Shojaei Baghini et al., 2022).

La capacidad de programación del sistema CRISPR-Cas depende principalmente de la modificación de la secuencia guía, lo que permite dirigir la nucleasa hacia diferentes regiones genómicas siempre que exista un motivo adyacente al protoespaciador (PAM) compatible (Prasad et al., 2021; Shojaei Baghini et al., 2022). Esta característica proporcionó una plataforma altamente adaptable para aplicaciones relacionadas con la corrección de mutaciones, regulación génica y generación de modelos experimentales en diferentes áreas de la biología molecular.

El sistema utilizado actualmente en aplicaciones biotecnológicas está compuesto principalmente por una proteína Cas y un ARN guía sintético (sgRNA), molécula quimérica que integra las funciones del crRNA y tracrRNA naturales (Prasad et al., 2021; Shojaei Baghini et al., 2022). El sgRNA dirige la proteína Cas hacia la secuencia objetivo mediante complementariedad de bases, permitiendo que los dominios catalíticos HNH y RuvC generen la ruptura del ADN en el sitio seleccionado (Li et al., 2023; Shojaei Baghini et al., 2022).

Entre los diferentes efectores disponibles, la variante SpCas9 derivada de *Streptococcus pyogenes* continúa siendo la plataforma más utilizada debido a su eficiencia y facilidad de programación. Sin embargo, otros efectores de Clase 2, como Cpf1 o Cas12a, han adquirido relevancia por sus características particulares, incluyendo patrones alternativos de reconocimiento PAM y aplicaciones específicas en estudios de cribado genético (Shojaei Baghini et al., 2022).

Inducción de roturas de doble cadena y mecanismos de reparación celular

Las roturas de doble cadena generadas por Cas9 activan principalmente dos rutas de reparación celular competitivas: la unión de extremos no homólogos (NHEJ) y la reparación dirigida por homología (HDR). La elección entre ambas vías depende del contexto celular, la disponibilidad de moldes de reparación y la fase del ciclo celular en la que se encuentre la célula, determinando la precisión y el tipo de modificación genética obtenida (Li et al., 2021; Prasad et al., 2021; Shojaei Baghini et al., 2022).

La vía NHEJ constituye el mecanismo de reparación predominante en células eucariotas debido a que no requiere la presencia de un molde externo de ADN para restaurar la continuidad de la molécula afectada (Li et al., 2021; Sharma et al., 2021). Aunque este proceso permite una reparación rápida, presenta una elevada probabilidad de introducir errores durante la unión de los extremos rotos, generando inserciones o deleciones de nucleótidos conocidas como indels.

La incorporación de estas alteraciones puede modificar el marco de lectura del gen y producir mutaciones tipo *frameshift* o *nonsense*, provocando la pérdida funcional del gen objetivo mediante un mecanismo denominado *knockout* génico (Kubikova et al., 2023; Li et al., 2021; Zheng et al., 2023). Debido a esta característica, NHEJ se emplea principalmente cuando el objetivo experimental consiste en inhibir la función de un gen específico o estudiar la relación entre genes y fenotipos celulares.

Además de la reparación convencional mediante NHEJ, se han desarrollado estrategias basadas en esta vía para obtener modificaciones genéticas más complejas, incluyendo grandes deleciones o inserciones específicas. Estas aproximaciones incorporan elementos adicionales como endonucleasas de corte dirigido, múltiples sgRNA coordinados, sistemas CRISPR de Clase 1 y oligodesoxinucleótidos de doble cadena (dsODNs) para favorecer modificaciones estructurales controladas (Liu et al., 2022).

Edición génica basada en la vía HDR

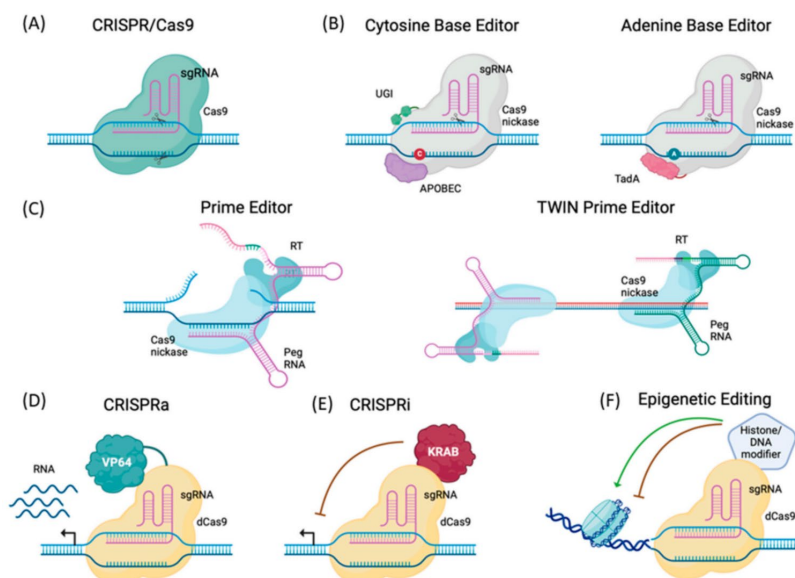
La reparación dirigida por homología (HDR) representa una alternativa de mayor precisión frente a NHEJ, debido a que utiliza una molécula de ADN homóloga como molde para restaurar o modificar secuencias genéticas específicas (Li et al., 2021). Mediante el suministro de moldes sintéticos con regiones de homología, esta vía permite realizar inserciones, sustituciones o correcciones dirigidas conocidas como modificaciones *knock-in* (Li et al., 2021; Zheng et al., 2023).

A pesar de su elevada precisión, HDR presenta una eficiencia limitada en comparación con NHEJ y depende principalmente de la disponibilidad del molde de reparación durante las fases S y G2/M del ciclo celular (Li et al., 2021; Liu et al., 2022; Sharma et al., 2021). Esta restricción constituye una de las principales dificultades para su aplicación terapéutica, especialmente en células con baja capacidad proliferativa o en tejidos diferenciados.

Con el propósito de incrementar la eficiencia de HDR, se han desarrollado diversas estrategias moleculares orientadas a favorecer la interacción entre la maquinaria de reparación y el sistema CRISPR-Cas. Entre estas estrategias se incluyen la sincronización del ciclo celular, la inhibición temporal de componentes de NHEJ, la generación de cortes escalonados (*staggered cuts*) y el acoplamiento físico de las enzimas reparadoras o del molde donante con la nucleasa Cas9 (Prasad et al., 2021; Sharma et al., 2021).

En conjunto, las vías NHEJ y HDR representan mecanismos fundamentales para determinar el resultado de la edición mediada por CRISPR-Cas. Mientras NHEJ proporciona una herramienta eficiente para la inactivación génica, HDR ofrece mayor precisión para correcciones específicas; sin embargo, sus limitaciones han impulsado el desarrollo de nuevas tecnologías de edición que reduzcan la dependencia de roturas de doble cadena (Li et al., 2021; Prasad et al., 2021).

La figura 3 representa de manera esquemática el conjunto de herramientas de edición génica derivadas del sistema CRISPR-Cas9, mostrando la evolución desde la edición convencional basada en roturas de doble cadena del ADN hacia plataformas de precisión capaces de modificar nucleótidos específicos, regular la expresión génica y alterar mecanismos epigenéticos sin modificar permanentemente la secuencia genómica.

Figura 3*Herramientas de edición génica de CRISPR-Cas9*

Nota. Adaptado de Laurent et al., (2024)

En el panel (A) se representa el sistema CRISPR/Cas9 convencional, compuesto por la nucleasa Cas9 y un ARN guía sintético (sgRNA) que dirige el complejo hacia una secuencia específica del ADN mediante complementariedad de bases. La unión del complejo permite generar una rotura de doble cadena, posteriormente reparada por los mecanismos celulares endógenos, principalmente la unión de extremos no homólogos (NHEJ) o la reparación dirigida por homología (HDR).

El panel (B) muestra los sistemas de edición de bases, incluyendo los editores de citosina (*Cytosine Base Editor*) y adenina (*Adenine Base Editor*). Estas herramientas utilizan una Cas9 modificada, generalmente una Cas9 nickasa, fusionada con enzimas desaminasas como APOBEC o TadA, permitiendo conversiones específicas de nucleótidos sin generar roturas completas del ADN. Los editores de citosina favorecen transiciones C:G a T:A, mientras que los editores de adenina permiten conversiones A:T a G:C mediante mecanismos de desaminación controlada.

El panel (C) representa la tecnología Prime Editing, una plataforma de edición de precisión basada en la fusión de una Cas9 nickasa con una transcriptasa inversa (RT), guiada por un ARN de edición primaria (*pegRNA*). Este sistema funciona mediante un mecanismo de búsqueda y reemplazo que permite introducir sustituciones, inserciones y deleciones sin requerir roturas de doble cadena ni moldes externos de ADN. Además, se muestra la variante Twin Prime Editor, diseñada para ampliar la capacidad de modificación mediante el uso coordinado de dos sistemas de edición primaria.

El panel (D) representa la herramienta CRISPRa (CRISPR activation), basada en una proteína Cas9 inactiva catalíticamente (dCas9) fusionada con dominios activadores como VP64. Esta plataforma permite aumentar la expresión de genes específicos mediante el reclutamiento de factores transcripcionales hacia regiones reguladoras del ADN, sin modificar la secuencia genética original.

El panel (E) muestra CRISPRi (CRISPR interference), donde dCas9 se encuentra asociada con dominios represores como KRAB. Este sistema bloquea la transcripción mediante interferencia física o

modificación del entorno cromatínico, permitiendo disminuir la expresión génica de manera reversible sin producir cortes en el ADN.

Finalmente, el panel (F) representa la edición epigenética, en la cual dCas9 actúa como plataforma de direccionamiento para reclutar modificadores de histonas o enzimas reguladoras de la metilación del ADN. Estas herramientas permiten modificar estados epigenéticos asociados con la activación o represión génica, manteniendo la integridad de la secuencia genética.

En conjunto, la figura evidencia la diversificación tecnológica del sistema CRISPR-Cas9 desde una herramienta inicial de corte genómico hacia un repertorio avanzado de plataformas de precisión. Estas variantes permiten abordar diferentes objetivos moleculares, incluyendo corrección de mutaciones puntuales, regulación transcripcional y modificación epigenética, ampliando sus aplicaciones en investigación biomédica y terapias génicas.

Tecnologías de edición de precisión de última generación

Las limitaciones asociadas con las roturas de doble cadena (DSBs) generadas por los sistemas CRISPR-Cas convencionales impulsaron el desarrollo de nuevas herramientas de edición de precisión capaces de modificar secuencias genómicas sin producir fragmentación del ADN. Estas tecnologías buscan reducir la aparición de inserciones y deleciones inespecíficas (indels), disminuir los eventos de edición no deseados y ampliar las posibilidades terapéuticas de la ingeniería genética (Prasad et al., 2021; Zhang et al., 2025). La Figura 3 representa las principales plataformas de edición desarrolladas a partir de CRISPR-Cas9.

Editores de bases (*Base Editing*)

Los editores de bases representan una estrategia de modificación genética que combina una nucleasa Cas modificada, generalmente una Cas9 nickasa (nCas9) o Cas9 inactiva (dCas9), con enzimas desaminasas capaces de transformar nucleótidos específicos sin generar roturas de doble cadena en el ADN (Laurent et al., 2024; Ma et al., 2024; Navarro et al., 2025; Prasad et al., 2021; Tyumentseva et al., 2023). Esta característica permite realizar cambios puntuales controlados dentro de ventanas de actividad determinadas, reduciendo los daños genómicos asociados con la edición convencional.

Los editores de bases presentan un importante potencial terapéutico debido a su capacidad para corregir aproximadamente el 60 % de las mutaciones puntuales patogénicas humanas conocidas (Laurent et al., 2024). Estas herramientas se clasifican principalmente en editores de citosina, editores de adenina y plataformas derivadas capaces de generar modificaciones más complejas mediante la combinación de diferentes actividades enzimáticas.

Los editores de bases de citosina (CBEs) catalizan la desaminación de citosina (C) a uracilo (U), generando transiciones de bases C:G a T:A mediante mecanismos independientes de roturas de doble cadena (Li et al., 2021; Navarro et al., 2025). Estas plataformas incorporan dominios inhibidores de la uracil glicosilasa (UGI), cuya función consiste en bloquear la reparación por escisión de bases y reducir la generación de indels, evolucionando desde las primeras versiones BE1 y BE2 hasta sistemas optimizados como BE4 (Li et al., 2021; Li et al., 2023; Liu et al., 2022; Navarro et al., 2025).

Los editores de bases de adenina (ABEs) utilizan una adenosina desaminasa evolucionada (TadA*) para convertir adenina (A) en inosina (I), la cual es interpretada como guanina durante la replicación, permitiendo transiciones A:T a G:C (Li et al., 2023; Navarro et al., 2025). Entre las variantes más avanzadas destacan ABE7.10, ABE8 y ABE8e, debido a su mayor actividad catalítica

y capacidad de edición en comparación con las versiones iniciales (Li et al., 2023; Navarro et al., 2025).

Además de los CBEs y ABEs, se han desarrollado nuevos sistemas orientados a ampliar el rango de modificaciones posibles. Los editores de guanina (GBEs), citosina-guanosina (CGBEs) y editores duales como ACE permiten generar transversiones específicas o combinar diferentes actividades de edición dentro de una misma plataforma (Laurent et al., 2024; Li et al., 2021; Prasad et al., 2021; Zhang et al., 2025).

A pesar de sus ventajas, los editores de bases presentan limitaciones relacionadas con la aparición de efectos *off-target* genómicos y transcriptómicos, edición inespecífica de bases cercanas (*bystander editing*) y dificultad para generar modificaciones estructurales complejas como inserciones o deleciones extensas (Laurent et al., 2024; Liu et al., 2022; Zhang et al., 2025). Para disminuir estos problemas se han desarrollado estrategias basadas en desaminasas de mayor fidelidad, estabilización del bucle R (*R-loop*) y proteínas anti-CRISPR como AcrIIA4 y AcrIIA5 (Liu et al., 2022; Navarro et al., 2025).

En el ámbito clínico, los editores de bases han demostrado aplicaciones relevantes, como la plataforma VERVE-101 dirigida a la regulación del gen PCSK9 en tejido hepático y diferentes ensayos orientados al tratamiento de enfermedades como infección por VIH-1 y atrofia muscular espinal (Tyumentseva et al., 2023; Zhang et al., 2025). Estos avances evidencian el potencial de esta tecnología, aunque su implementación requiere continuar optimizando la seguridad y especificidad del proceso.

Edición primaria o de precisión (Prime Editing)

La edición primaria (*Prime Editing*) constituye una plataforma avanzada desarrollada en 2019 que funciona mediante un mecanismo de búsqueda y reemplazo molecular, permitiendo introducir sustituciones, inserciones y deleciones sin necesidad de generar roturas de doble cadena ni utilizar moldes externos de ADN (Li et al., 2021; Prasad et al., 2021). Esta característica amplió significativamente las posibilidades de edición genética al reducir los daños asociados con los sistemas tradicionales basados en DSB.

El sistema Prime Editing se basa en la fusión de una transcriptasa inversa (RT) con una Cas9 nickasa (nCas9 H840A), la cual es dirigida hacia la región objetivo mediante un ARN guía de edición primaria denominado pegRNA (Navarro et al., 2025; Prasad et al., 2021). Esta molécula contiene una región de unión al cebador (PBS) y un molde de transcriptasa inversa (RTT) que incorpora la información genética necesaria para introducir la modificación deseada (Li et al., 2023; Liu et al., 2022).

Tras el reconocimiento de la secuencia objetivo, la nCas9 genera un corte en una sola cadena del ADN, permitiendo que el pegRNA se hibride con la región expuesta y facilite la síntesis de la nueva secuencia mediante la actividad de la transcriptasa inversa. Posteriormente, la célula integra la modificación generada durante el proceso de reparación, estableciendo una corrección genética estable (Li et al., 2023; Navarro et al., 2025).

Debido a su mecanismo de acción, Prime Editing presenta una elevada especificidad y menor frecuencia de efectos fuera del objetivo en comparación con otras plataformas de edición de precisión. Se ha estimado que esta tecnología podría corregir hasta el 89 % de las mutaciones patogénicas humanas conocidas; sin embargo, su eficiencia catalítica continúa siendo inferior a la observada en algunos editores de bases (Davis et al., 2024; Lee et al., 2024; Navarro et al., 2025).

Para mejorar su rendimiento se han desarrollado diversas optimizaciones, entre ellas las variantes PE3 y PE6. La primera incorpora un corte adicional en la hebra no editada para favorecer la

incorporación de la modificación, mientras que PE6 integra transcriptasas inversas evolucionadas con mayor velocidad catalítica y estabilidad funcional (Liu et al., 2022; Zhang et al., 2025).

Asimismo, la ingeniería de ARN guía permitió desarrollar epegRNAs y Dual-pegRNAs, estructuras diseñadas para mejorar la estabilidad molecular y facilitar modificaciones complejas como grandes inserciones o deleciones mediante herramientas derivadas como HOPE, PRIME-Del, twinPE y PETI (Liu et al., 2022; Zhang et al., 2025). También se han explorado estrategias basadas en la inhibición temporal de la reparación de errores de apareamiento (MMR) y el empleo de nuevos ortólogos Cas para ampliar su aplicación en diferentes organismos y tipos celulares (Tyumentseva et al., 2023; Liu et al., 2022).

En modelos preclínicos, Prime Editing ha demostrado capacidad para modificar células madre y progenitoras hematopoyéticas en enfermedades como anemia de células falciformes y enfermedad de Tay-Sachs, manteniendo la capacidad de regeneración celular (Tyumentseva et al., 2023; Zhang et al., 2025). Actualmente, los principales esfuerzos se concentran en mejorar la bioseguridad a largo plazo y optimizar los sistemas de entrega mediante complejos ribonucleoproteicos (RNP) y plataformas divididas (*split-PE*) (Liu et al., 2022; Modell et al., 2022).

Modulación de la expresión génica y edición epigenética

La evolución de los sistemas CRISPR-Cas permitió desarrollar herramientas capaces de regular la expresión génica sin modificar permanentemente la secuencia del ADN. Estas estrategias se basan principalmente en el uso de la proteína Cas9 catalíticamente inactiva (dCas9), la cual conserva la capacidad de direccionamiento mediante ARN guía, pero carece de actividad endonucleasa debido a mutaciones en sus dominios catalíticos (Bhat et al., 2022; Prasad et al., 2021; Tyumentseva et al., 2023).

La proteína dCas9 puede actuar como un bloqueador físico de la maquinaria transcripcional al interferir con la ARN polimerasa o con factores reguladores asociados al inicio de la transcripción. Además, su fusión con dominios activadores, represores o modificadores de cromatina permite controlar de manera reversible la expresión de genes específicos sin generar alteraciones permanentes en la estructura del ADN (Navarro et al., 2025).

Sistemas de interferencia y activación transcripcional (CRISPRi y CRISPRa)

Las plataformas CRISPRi y CRISPRa representan herramientas de regulación génica basadas en dCas9, cuya eficacia depende del diseño preciso de ARN guía dirigidos hacia regiones promotoras o sitios de inicio de transcripción (TSS). La accesibilidad de la cromatina y el grado de compactación del ADN influyen directamente en la capacidad del complejo para modular la actividad transcripcional del gen objetivo (Navarro et al., 2025).

CRISPRi (*CRISPR interference*) utiliza dCas9 para bloquear la expresión génica mediante interferencia física con la maquinaria de transcripción. Aunque dCas9 sin modificaciones puede producir represión parcial de la expresión génica, su combinación con dominios represores como KRAB, el dominio *chromoshadow* (CS) de HP1 α , WPRW o SID4X incrementa significativamente la capacidad de silenciamiento, siendo dCas9-KRAB una de las configuraciones más utilizadas (Li et al., 2021; Liu et al., 2022; Prasad et al., 2021).

Por otra parte, CRISPRa (*CRISPR activation*) emplea dCas9 fusionada con dominios activadores para estimular la expresión de genes endógenos sin modificar su secuencia nucleotídica. Las primeras aproximaciones utilizaron el activador VP64; posteriormente, la incorporación de múltiples ARN guía, aptámeros de ARN en el andamio del sgRNA y sistemas de reclutamiento multimérico como SunTag

incrementaron la capacidad de activación transcripcional (Li et al., 2023; Liu et al., 2022; Zhang et al., 2025).

A pesar de sus ventajas, estas plataformas presentan limitaciones asociadas con la especificidad del direccionamiento y la posibilidad de modificar regiones reguladoras cercanas al sitio objetivo. La presencia de promotores bidireccionales o genes superpuestos puede favorecer alteraciones no deseadas en loci adyacentes debido a la acción inespecífica de dominios reguladores como KRAB o VP64 (Modell et al., 2022).

Edición epigenética (*Epigenome Editing*)

La edición epigenética constituye una estrategia avanzada basada en CRISPR-Cas que permite modificar estados regulatorios de la cromatina mediante cambios dirigidos en patrones de metilación del ADN, modificaciones postraduccionales de histonas y regulación de ARN no codificantes, sin alterar la secuencia genética primaria (Li et al., 2021). Esta característica convierte a estas herramientas en alternativas relevantes para estudiar mecanismos de regulación génica y enfermedades asociadas con alteraciones epigenéticas.

La modulación de la metilación del ADN se logra mediante la fusión de dCas9 con dominios catalíticos de enzimas epigenéticas específicas. La plataforma dCas9-DNMT3A permite inducir metilación de novo en regiones próximas al motivo PAM mediante el reclutamiento dirigido de la ADN metiltransferasa 3A, utilizando enlaces flexibles como Gly4Ser para favorecer la interacción molecular (Tyumentseva et al., 2023; Zheng et al., 2023).

Con el objetivo de mejorar la precisión del proceso, se han desarrollado arquitecturas modulares como dCas9-SunTag-DNMT3A, las cuales permiten reducir eventos fuera del objetivo mediante un reclutamiento más controlado del dominio catalítico. Estas modificaciones incrementan la especificidad de la metilación dirigida y amplían las posibilidades de aplicación en estudios funcionales del epigenoma (Tyumentseva et al., 2023; Zheng et al., 2023).

En sentido contrario, los sistemas basados en dCas9-TET1CD permiten eliminar marcas de metilación mediante el reclutamiento del dominio catalítico de la enzima TET1. Esta estrategia facilita la reactivación de genes silenciados y permite estudiar la función de regiones reguladoras específicas mediante modificaciones epigenéticas reversibles (Tyumentseva et al., 2023).

El empleo de adaptadores derivados del bacteriófago MS2 integrados en el ARN guía ha permitido aumentar la capacidad de reclutamiento de dominios TET1CD, logrando una eliminación significativa de la metilación en regiones seleccionadas. Estas plataformas han sido utilizadas para estudiar epialelos en plantas y procesos relacionados con la activación de genes supresores tumorales (Li et al., 2021; Tyumentseva et al., 2023).

Modificación postraducciona l de histonas

La regulación de la estructura de la cromatina depende en gran medida de modificaciones químicas sobre las histonas, las cuales determinan la accesibilidad del ADN para la maquinaria transcripcional. Los sistemas basados en CRISPR-Cas permiten dirigir enzimas modificadoras de histonas hacia regiones genómicas específicas, facilitando el estudio de mecanismos regulatorios asociados con la expresión génica (Li et al., 2021).

La fusión dCas9-LSD1 permite eliminar grupos metilo presentes en la histona H3K4, reduciendo la actividad de regiones potenciadoras (*enhancers*) específicas y modificando la accesibilidad

transcripcional de determinados genes (Li et al., 2021). Esta estrategia proporciona una herramienta precisa para investigar la función de elementos reguladores dentro del genoma.

Por otra parte, los sistemas dCas9-HDAC1 y dCas9-p300 permiten modificar estados de acetilación de histonas mediante mecanismos opuestos. Mientras dCas9-HDAC1 favorece la compactación de la cromatina y el silenciamiento génico, dCas9-p300 incorpora actividad acetiltransferasa que promueve la apertura cromatínica y aumenta la activación transcripcional de genes específicos (Li et al., 2021; Tyumentseva et al., 2023).

La plataforma dCas9-p300 ha demostrado una capacidad elevada para incrementar la expresión génica respecto a niveles basales, manteniendo además un perfil reducido de inmunogenicidad en modelos experimentales. Estas características han impulsado su investigación como herramienta potencial para aplicaciones terapéuticas basadas en regulación epigenética (Tyumentseva et al., 2023).

Manipulación de ARN no codificantes y memoria epigenética

Las herramientas CRISPR-Cas también han permitido investigar la función de ARN no codificantes mediante la regulación dirigida de genes precursores de microARN, incluyendo moléculas como miR-21, miR-30c y miR-663a. Estas aplicaciones han contribuido al análisis de redes reguladoras relacionadas con procesos tumorales y mecanismos de señalización celular (Li et al., 2021).

Dentro de las estrategias de memoria epigenética destaca CRISPROff, una plataforma basada en dCas9 diseñada para inducir silenciamiento génico estable mediante la combinación de metilación del ADN y modificaciones represivas de histonas (Tyumentseva et al., 2023). Esta herramienta permite regular genes incluso en regiones con baja presencia de islas CpG y presenta una amplia capacidad de direccionamiento en regiones promotoras.

Además, CRISPROff mantiene la represión génica durante procesos de división y diferenciación celular, característica que representa una ventaja frente a sistemas tradicionales de regulación transitoria. Su capacidad para generar cambios epigenéticos heredables amplía las posibilidades de aplicación en investigación biomédica y desarrollo de terapias reguladoras de la expresión génica (Tyumentseva et al., 2023).

Estrategias de entrega de los sistemas CRISPR-Cas en edición génica

La aplicación efectiva de las herramientas CRISPR-Cas *in vivo* requiere superar diversas barreras biofísicas relacionadas con la estabilidad molecular, la distribución tisular y la liberación intracelular de los componentes de edición. Para lograr una modificación genética eficiente, las cargas terapéuticas deben mantener su integridad durante el transporte sistémico, alcanzar selectivamente el tejido objetivo y superar las barreras celulares, especialmente el escape del compartimento endosomal (Li et al., 2023).

Los componentes CRISPR-Cas pueden administrarse mediante diferentes formatos moleculares, incluyendo ARN mensajero (ARNm), ARN guía sintético (sgRNA), plásmidos de ADN o complejos ribonucleoproteicos (RNP). Estos elementos pueden ser transportados mediante sistemas virales o no virales, cuya selección depende del tipo celular, duración requerida de la expresión y perfil de seguridad esperado (Davis et al., 2024; Navarro et al., 2025; Tyumentseva et al., 2023).

Estrategias de entrega viral

Los vectores virales representan una de las primeras aproximaciones desarrolladas para transportar componentes CRISPR-Cas debido a su capacidad natural de introducir material genético en células

específicas. Estos sistemas se producen generalmente mediante líneas celulares de empaquetamiento, como HEK 293T, con el propósito de generar partículas virales capaces de transportar nucleasas y ARN guía hacia las células diana (Navarro et al., 2025; Tyumentseva et al., 2023).

A pesar de su elevada eficiencia de transducción, los vectores virales presentan limitaciones asociadas con la respuesta inmunitaria del hospedador, capacidad restringida de carga genética y riesgos potenciales derivados de la expresión prolongada de los componentes CRISPR-Cas. Por esta razón, se han desarrollado modificaciones estructurales y sistemas alternativos destinados a mejorar su seguridad y aplicabilidad clínica.

Vectores adenovirales (AdV)

Los adenovirus son virus de ADN bicatenario-capaces de transducir células en división y células quiescentes, manteniendo principalmente su material genético de forma episomal dentro de la célula hospedadora (Navarro et al., 2025). Esta característica reduce el riesgo de mutagénesis insercional y permite obtener niveles elevados de expresión de los componentes CRISPR-Cas.

Entre sus principales ventajas destacan la alta eficiencia de transferencia genética y la capacidad de inducir respuestas inmunológicas relativamente controladas en determinados contextos experimentales (Navarro et al., 2025). Sin embargo, su principal limitación corresponde al tamaño reducido de la carga genética disponible, lo que dificulta la incorporación simultánea de nucleasas Cas grandes y sus elementos reguladores dentro de un único vector.

Para superar esta restricción, se han desarrollado estrategias basadas en la utilización de vectores independientes para transportar la proteína Cas y el ARN guía, permitiendo la administración combinada de diferentes componentes del sistema de edición (Navarro et al., 2025). No obstante, estas aproximaciones pueden disminuir la eficiencia global debido a la necesidad de una entrega coordinada dentro de la misma célula.

Vectores de virus adenoasociados (AAV)

Los vectores derivados de virus adenoasociados (AAV) constituyen una de las plataformas virales más utilizadas debido a su bajo perfil inmunogénico, reducida capacidad inflamatoria y adecuada eficiencia de transferencia genética (Davis et al., 2024; Li et al., 2023; Navarro et al., 2025). Estas características han favorecido su aplicación en estudios preclínicos y terapias génicas dirigidas a tejidos específicos.

Sin embargo, los AAV presentan una capacidad limitada de empaquetamiento cercana a 4,7 kb, lo que restringe la incorporación de nucleasas Cas de gran tamaño o fusiones con dominios reguladores adicionales (Li et al., 2023; Navarro et al., 2025). Esta limitación ha impulsado el desarrollo de estrategias alternativas basadas en nucleasas compactas como SaCas9 y sistemas divididos de Cas9 (*split-Cas9*).

Los sistemas duales o triples de vectores permiten distribuir los componentes CRISPR-Cas en diferentes partículas virales, facilitando el transporte de herramientas de mayor tamaño molecular. Sin embargo, estas estrategias pueden incrementar la complejidad del proceso y favorecer fenómenos asociados con citotoxicidad o generación de roturas inespecíficas del ADN (Li et al., 2023; Navarro et al., 2025).

Vectores lentivirales (LV)

Los vectores lentivirales corresponden a sistemas derivados de virus ARN monocatenarios con amplia capacidad de clonación y capacidad para introducir material genético tanto en células en división como

en células quiescentes (Li et al., 2023; Navarro et al., 2025). Su tropismo puede modificarse mediante procesos de pseudotipado, permitiendo adaptar su distribución hacia diferentes tipos celulares.

Una característica distintiva de los lentivirus es su capacidad de integración estable en el genoma de la célula hospedadora, lo que favorece una expresión prolongada de los componentes introducidos. Sin embargo, esta integración representa una limitación importante debido al riesgo potencial de mutagénesis insercional y alteraciones genómicas no deseadas (Li et al., 2023; Navarro et al., 2025).

Para mejorar su perfil de seguridad se han desarrollado vectores lentivirales deficientes en integración (IDLV), además de estrategias destinadas a limitar temporalmente la actividad de Cas9 dentro de la célula. Estas aproximaciones buscan mantener las ventajas de transferencia genética de los lentivirus reduciendo los riesgos asociados con la permanencia prolongada del sistema de edición (Navarro et al., 2025).

Estrategias de entrega no viral

Los sistemas no virales representan alternativas de creciente interés debido a su mayor flexibilidad de diseño, menor riesgo de integración genómica y ausencia de restricciones estrictas respecto al tamaño de la carga molecular (Navarro et al., 2025; Davis et al., 2024). Estas plataformas incluyen métodos físicos y sistemas basados en materiales nanotecnológicos capaces de transportar ADN, ARN o complejos ribonucleoproteicos.

A diferencia de los vectores virales, los sistemas no virales permiten modificar con mayor facilidad sus propiedades fisicoquímicas para mejorar la estabilidad, biodistribución y liberación intracelular. Sin embargo, todavía presentan desafíos relacionados con la eficiencia de entrada celular, escape endosomal, degradación molecular y posible toxicidad asociada con algunos materiales empleados (Navarro et al., 2025).

Métodos físicos de entrega

Los métodos físicos constituyen estrategias directas para introducir componentes CRISPR-Cas dentro de células mediante modificaciones temporales de la membrana celular. Aunque ofrecen alta precisión y evitan la utilización de vectores biológicos, presentan limitaciones relacionadas con la baja escalabilidad, daño celular y dificultad para aplicaciones sistémicas.

La microinyección consiste en la introducción directa de plásmidos, ARNm o complejos RNP mediante microagujas hacia el citoplasma o núcleo celular (Navarro et al., 2025). Esta técnica presenta elevada precisión y bajos niveles de efectos fuera del objetivo, pero su aplicación se limita debido al bajo rendimiento experimental y al daño mecánico producido durante el procedimiento.

Esta estrategia ha sido empleada en diferentes modelos experimentales, incluyendo embriones de ratón, artrópodos y organismos vegetales. Estudios recientes han aplicado la microinyección para modificar microsporas de trigo y embriones de *Neocaridina heteropoda*, demostrando su utilidad en investigaciones específicas de edición genética (Navarro et al., 2025).

La electroporación representa otro método ampliamente utilizado y consiste en la aplicación de pulsos eléctricos capaces de generar poros transitorios en la membrana plasmática, facilitando la entrada de componentes CRISPR-Cas en células cultivadas o modelos experimentales (Navarro et al., 2025). Su eficiencia depende de la optimización de parámetros eléctricos para equilibrar la transferencia molecular y la supervivencia celular.

Esta estrategia ha sido aplicada mediante plataformas como MaxCyte y 4D para introducir complejos RNP en células madre pluripotentes, demostrando utilidad en procesos de edición *ex vivo* destinados a aplicaciones terapéuticas (Navarro et al., 2025).

La transferencia hidrodinámica consiste en la administración rápida de grandes volúmenes de solución genética, generalmente mediante inyección en la vena caudal de modelos animales, generando presión temporal que favorece la entrada de componentes CRISPR-Cas en hepatocitos y otros tejidos (Navarro et al., 2025). Sin embargo, debido al riesgo de sobrecarga volumétrica, hipertensión aguda y alteraciones cardiovasculares, esta estrategia presenta baja viabilidad para aplicaciones clínicas humanas.

Nanopartículas como sistemas de entrega no viral

Las nanopartículas representan una de las estrategias no virales con mayor desarrollo para la administración de componentes CRISPR-Cas debido a su capacidad de transportar diferentes tipos de cargas moleculares, incluyendo ADN plasmídico, ARN mensajero, ARN guía y complejos ribonucleoproteicos (RNP) (Li et al., 2023; Zheng et al., 2023). Estas plataformas presentan ventajas relacionadas con su estabilidad estructural, capacidad de modificación superficial y posibilidad de direccionamiento hacia tejidos específicos.

Sistemas basados en nanopartículas lipídicas

Las nanopartículas lipídicas (LNPs) constituyen uno de los sistemas de administración más estudiados debido a su elevada biocompatibilidad, capacidad de encapsulación y eficiencia para favorecer la liberación intracelular de moléculas terapéuticas. Generalmente están compuestas por lípidos ionizables, colesterol, fosfolípidos y polietilenglicol (PEG), componentes que favorecen la estabilidad en circulación y facilitan la entrada celular mediante procesos endocíticos (Li et al., 2023; Zheng et al., 2023).

Una de las principales ventajas de las LNPs es su capacidad para acumularse preferentemente en tejido hepático, lo que ha permitido desarrollar estrategias dirigidas contra genes expresados en hepatocitos. Entre los avances destacados se encuentra la nanopartícula lipídica bio reducible 306-O12B desarrollada para la edición del gen *Angptl3*, sistemas Incisive para aplicaciones corneales y nanopartículas sgPLK1-cLNPs utilizadas en modelos tumorales con alta eficiencia de edición *in vivo* (Li et al., 2023; Zheng et al., 2023).

Además, se han diseñado nuevos lípidos zwitteriónicos (ZALs) capaces de mejorar la estabilidad del complejo y favorecer la liberación intracelular de la carga genética. Estas plataformas han mostrado tasas elevadas de silenciamiento génico, alcanzando valores cercanos al 90 %, aunque persisten desafíos relacionados con la especificidad tisular y la distribución sistémica controlada (Li et al., 2023; Zheng et al., 2023).

Nanopartículas basadas en polímeros

Las nanopartículas poliméricas representan otra alternativa no viral utilizada para transportar componentes CRISPR-Cas debido a su capacidad de adaptación estructural y facilidad de modificación química. Estas plataformas presentan tamaños variables entre 1 y 1000 nm y pueden transportar plásmidos, ARN o complejos proteicos mediante mecanismos mediados por endocitosis celular (Li et al., 2023; Zheng et al., 2023).

Entre los materiales más utilizados destacan el quitosano, el ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA) y la polietilenimina (PEI). Esta última favorece la liberación endosomal mediante el denominado efecto “esponja de protones”, mecanismo que genera alteraciones osmóticas capaces de facilitar la salida del complejo CRISPR-Cas hacia el citoplasma celular (Li et al., 2023).

A pesar de su potencial terapéutico, estos sistemas requieren optimización debido a factores como la toxicidad asociada con determinados polímeros, la interacción inespecífica con proteínas plasmáticas y la necesidad de mejorar la eficiencia de liberación intracelular. Por ello, actualmente se investigan modificaciones superficiales que permitan incrementar la estabilidad y el direccionamiento hacia tejidos específicos.

Sistemas basados en nanopartículas de oro

Las nanopartículas de oro (AuNPs) han adquirido interés como vehículos de entrega debido a sus propiedades fisicoquímicas favorables, incluyendo estabilidad, biocompatibilidad y facilidad de funcionalización superficial (Li et al., 2023). Su tamaño y composición pueden modificarse para controlar la interacción con células específicas y mejorar la incorporación de componentes CRISPR-Cas.

Una característica distintiva de las AuNPs es su capacidad para presentar resonancia de plasmón superficial, fenómeno asociado con la oscilación colectiva de electrones en respuesta a determinadas longitudes de onda. Esta propiedad ha favorecido su aplicación en sistemas de detección molecular, liberación controlada y desarrollo de plataformas terapéuticas dirigidas (Li et al., 2023).

Además, la incorporación de ligandos específicos en la superficie de las nanopartículas permite mejorar el reconocimiento de tejidos patológicos, especialmente en modelos tumorales. Estas características convierten a las AuNPs en herramientas prometedoras para aumentar la precisión de la entrega genética y reducir efectos adversos asociados con la distribución inespecífica.

Aplicaciones ex vivo de los sistemas de entrega CRISPR-Cas

Los sistemas de entrega molecular también han permitido consolidar estrategias terapéuticas basadas en edición genética ex vivo, en las cuales las células del paciente son modificadas en condiciones controladas antes de ser reintroducidas al organismo. Este enfoque reduce algunas limitaciones asociadas con la administración sistémica y permite realizar controles de calidad previos a la aplicación clínica (Davis et al., 2024).

Entre las aplicaciones más avanzadas destacan los tratamientos dirigidos contra enfermedades hematológicas, como la anemia falciforme, y las estrategias de inmunoterapia celular contra cáncer. En estos casos, las células modificadas mediante CRISPR-Cas pueden evaluarse antes de su administración, incrementando la seguridad y reduciendo el riesgo de eventos genéticos no deseados (Davis et al., 2024).

A pesar de los avances alcanzados, la aplicación clínica generalizada de CRISPR-Cas continúa limitada por desafíos relacionados con la entrega eficiente, la duración de la expresión, la respuesta inmunológica y la seguridad genética a largo plazo. Estos factores representan los principales obstáculos para transformar las plataformas experimentales actuales en tratamientos ampliamente disponibles.

Desafíos y limitaciones en la aplicación de los sistemas CRISPR-Cas

La consolidación de las tecnologías CRISPR-Cas como herramientas terapéuticas requiere resolver múltiples limitaciones relacionadas con la especificidad molecular, la bioseguridad y la administración eficiente de los componentes de edición. Entre los principales desafíos identificados destacan la

actividad fuera del objetivo (*off-target*), los eventos de reordenamiento genómico, las restricciones de entrega y las respuestas inmunológicas del hospedador (Lafi et al., 2025; Li et al., 2023; Liu et al., 2022; Prasad et al., 2021).

Estas limitaciones condicionan la eficacia y seguridad de las aplicaciones clínicas, especialmente en estrategias *in vivo*, donde los componentes CRISPR-Cas deben alcanzar tejidos específicos sin generar modificaciones no deseadas en células sanas. Por esta razón, los avances actuales se enfocan en mejorar la fidelidad de las nucleasas, optimizar los sistemas de transporte y reducir la exposición inmunológica.

Actividad fuera de objetivo (Off-Target Effects) y alteraciones genómicas

Uno de los principales desafíos técnicos del sistema CRISPR-Cas corresponde a la aparición de modificaciones genéticas en regiones diferentes al sitio objetivo. Estos eventos ocurren debido a que determinadas nucleasas, especialmente Cas9, pueden tolerar desajustes parciales entre el ARN guía y la secuencia diana, permitiendo la unión y corte en regiones con similitud molecular (Li et al., 2023; Prasad et al., 2021; Shojaei Baghini et al., 2022).

La tolerancia a errores de apareamiento suele presentarse con mayor frecuencia en regiones alejadas del motivo PAM, donde la estabilidad del complejo puede mantenerse mediante interacciones específicas del bucle RuvC y otros dominios estructurales de Cas9 (Li et al., 2023). En algunos casos, determinadas regiones con desajustes pueden presentar incluso mayor eficiencia de corte que la secuencia objetivo original (Zheng et al., 2023).

Las roturas de doble cadena no controladas pueden generar alteraciones genómicas importantes cuando son reparadas mediante mecanismos celulares como NHEJ. Entre estos eventos se incluyen grandes deleciones, inversiones cromosómicas, translocaciones e incorporación accidental de fragmentos de ADN externo (Sharma et al., 2021).

Además, la activación intensa de la vía p53 como respuesta al daño genómico puede inducir senescencia o apoptosis celular. Esta presión selectiva podría favorecer la supervivencia de células con alteraciones en mecanismos de control tumoral, incrementando potencialmente el riesgo de transformación oncogénica (Prasad et al., 2021; Zhang et al., 2021).

Estrategias para reducir los efectos fuera de objetivo

La detección de modificaciones no deseadas se realiza mediante metodologías avanzadas como SITE-seq, CIRCLE-seq, Digenome-seq, GUIDE-seq, T7E1 y secuenciación del genoma completo (WGS). Estas herramientas permiten identificar sitios potenciales de edición inespecífica, aunque la variabilidad genética celular puede modificar los perfiles observados entre diferentes modelos experimentales (Du et al., 2023; Li et al., 2023; Prasad et al., 2021; Sharma et al., 2021).

Una estrategia ampliamente estudiada corresponde al desarrollo de variantes Cas de alta fidelidad mediante modificaciones estructurales en regiones relacionadas con el reconocimiento del ADN. Entre estas variantes destacan HypaCas9, SpCas9-HF1, xCas9, evoCas9, SpCas9-NG y SuperFi-Cas9, diseñadas para reducir la interacción con secuencias parcialmente compatibles (Du et al., 2023; Li et al., 2023).

Otra aproximación consiste en modificar la arquitectura del ARN guía mediante guías truncadas, modificaciones químicas o estructuras en horquilla (*hairpin*). Estas modificaciones aumentan el umbral energético necesario para la formación del complejo activo, disminuyendo la posibilidad de reconocimiento inespecífico del ADN (Du et al., 2023; Li et al., 2023).

Asimismo, estrategias basadas en el control catalítico, como el uso de Cas9 nickasa mediante pares de ARN guía, fusiones dCas9-FokI y algoritmos de inteligencia artificial para optimizar el diseño de guías, han demostrado mejorar significativamente la precisión del proceso de edición (Sharma et al., 2021; Shojaei Baghini et al., 2022; Zhang et al., 2025).

Barreras de entrega física y limitaciones de los vectores

La transferencia eficiente de los componentes CRISPR-Cas constituye una de las principales limitaciones para su aplicación clínica, debido a que la administración sistémica depende de factores relacionados con el tamaño molecular, estabilidad, biodistribución y capacidad de alcanzar células específicas (Du et al., 2023; Li et al., 2023; Sharma et al., 2021). La administración directa de plásmidos, ARNm o complejos ribonucleoproteicos puede generar acumulación inespecífica en órganos como hígado y bazo, reduciendo la eficiencia terapéutica y aumentando el riesgo de alteraciones en tejidos sanos.

Los vectores virales, especialmente los virus adenoasociados (AAV) y lentivirus (LV), han demostrado una elevada capacidad de transducción y adaptación del tropismo celular; sin embargo, presentan restricciones relacionadas con la capacidad de carga, inmunogenicidad y posibles eventos de integración genómica (Prasad et al., 2021; Sharma et al., 2021). En particular, los lentivirus mantienen un riesgo asociado con la mutagénesis insercional, mientras que los AAV presentan limitaciones para transportar nucleasas de gran tamaño o sistemas de edición complejos.

Además, la expresión prolongada de Cas9 mediante vectores basados en ADN puede incrementar la probabilidad de efectos fuera del objetivo y respuestas celulares adversas debido a una exposición prolongada a la nucleasa (Du et al., 2023; Li et al., 2021). Por este motivo, los formatos transitorios basados en ARNm o complejos RNP han adquirido mayor relevancia, ya que permiten limitar la permanencia intracelular del sistema y reducir eventos de edición no deseados.

Los sistemas no virales, como las nanopartículas lipídicas y poliméricas, representan alternativas prometedoras debido a su flexibilidad estructural y menor riesgo de integración genética. No obstante, todavía enfrentan dificultades relacionadas con la degradación molecular, el aclaramiento inmunológico y la baja eficiencia de escape endosomal, factores que deben optimizarse antes de alcanzar una aplicación clínica amplia (Du et al., 2023; Sharma et al., 2021).

Estrategias para mejorar la distribución y liberación intracelular

El desarrollo de sistemas avanzados de direccionamiento busca incrementar la acumulación selectiva de los componentes CRISPR-Cas en tejidos específicos mediante modificaciones estructurales de los vehículos de transporte. Entre estas estrategias destacan la incorporación de péptidos de penetración celular, aptámeros y moléculas de reconocimiento capaces de favorecer la endocitosis mediada por receptores específicos (Du et al., 2023; Li et al., 2023).

Asimismo, la incorporación de secuencias de localización nuclear (NLS) en complejos ribonucleoproteicos facilita el transporte activo hacia el núcleo mediante la interacción con proteínas de importación celular como la importina α . Esta estrategia favorece la disponibilidad del sistema CRISPR-Cas en el compartimento donde ocurre la edición genética, incrementando la eficiencia del proceso (Du et al., 2023).

Otra línea de investigación corresponde al desarrollo de nanomateriales sensibles a estímulos del microambiente celular o patológico. Estas plataformas pueden responder a cambios de pH, especies

reactivas de oxígeno (ROS) o concentraciones específicas de ATP, permitiendo liberar la carga terapéutica de manera controlada en regiones determinadas del organismo (Li et al., 2023).

Además, se han evaluado estímulos externos como luz, campos magnéticos, ultrasonido y termoterapia para controlar espacialmente la liberación de los componentes CRISPR-Cas. Estas aproximaciones buscan mejorar la precisión terapéutica mediante una administración localizada y reducir la exposición sistémica del sistema de edición genética (Du et al., 2023; Li et al., 2023).

Inmunogenicidad y respuesta del hospedador

La inmunogenicidad representa una de las principales barreras para la aplicación *in vivo* de los sistemas CRISPR-Cas, debido a que algunas nucleasas utilizadas ampliamente, como SpCas9 y SaCas9, derivan de bacterias que pueden haber generado respuestas inmunológicas previas en el organismo humano (Prasad et al., 2021). La presencia de anticuerpos circulantes y células T de memoria frente a estas proteínas puede comprometer la eficacia del tratamiento y favorecer la eliminación de las células editadas.

Aunque esta limitación tiene menor impacto en estrategias *ex vivo*, donde las células pueden ser modificadas y evaluadas antes de su administración, representa un desafío crítico para tratamientos sistémicos. En aplicaciones *in vivo*, la respuesta inmunitaria puede neutralizar los vectores de entrega, activar mecanismos inflamatorios y reducir la permanencia funcional del sistema CRISPR-Cas dentro de las células objetivo (Prasad et al., 2021).

La administración sistémica de complejos CRISPR-Cas puede desencadenar respuestas inmunes humorales y celulares mediante la producción de anticuerpos neutralizantes y activación de linfocitos T citotóxicos dirigidos contra células modificadas genéticamente (Du et al., 2023; Prasad et al., 2021; Sharma et al., 2021). Estas respuestas pueden limitar la eficacia terapéutica y aumentar el riesgo de eventos adversos relacionados con inflamación sistémica.

Para reducir la inmunogenicidad se han desarrollado diversas estrategias, incluyendo la modificación estructural de las nucleasas mediante eliminación o sustitución de epítomos inmunogénicos, la utilización de sistemas de administración transitoria como complejos RNP y la búsqueda de nuevos ortólogos Cas provenientes de microorganismos con menor reactividad inmunológica en humanos (Li et al., 2023; Prasad et al., 2021).

Los sistemas basados en dCas9 para regulación transcripcional, como CRISPRi y CRISPRa, también representan alternativas potenciales debido a que evitan algunos eventos asociados con la ruptura del ADN y reducen la exposición a determinados componentes inmunogénicos derivados de la actividad catalítica (Li et al., 2023). En este contexto, la identificación de nuevas proteínas Cas provenientes de bacterias comensales o no patógenas constituye una estrategia relevante para mejorar la compatibilidad biológica de futuras terapias.

Síntesis de los avances y desafíos actuales

Los resultados evidencian que los sistemas CRISPR-Cas han evolucionado desde herramientas de edición genética basadas en roturas de doble cadena hacia plataformas de precisión capaces de modificar nucleótidos individuales, regular la expresión génica y remodelar estados epigenéticos. Tecnologías como Base Editing, Prime Editing, CRISPRi y CRISPRa han ampliado el potencial terapéutico al reducir algunos riesgos asociados con la edición convencional (Laurent et al., 2024; Navarro et al., 2025).

Sin embargo, la aplicación clínica continúa condicionada por limitaciones relacionadas con la seguridad genética, la eficiencia de entrega y la respuesta inmunológica del hospedador. Los efectos fuera del objetivo, la activación de mecanismos de reparación no deseados, las dificultades para alcanzar tejidos específicos y la inmunogenicidad de las nucleasas representan los principales desafíos identificados en la literatura analizada.

En conjunto, la evidencia revisada demuestra que el futuro de la ingeniería genómica mediante CRISPR-Cas dependerá del desarrollo integrado de nucleasas de mayor fidelidad, sistemas de transporte inteligentes y estrategias destinadas a controlar la interacción entre las herramientas de edición y el sistema inmunitario humano. Estos avances permitirán incrementar la seguridad y ampliar las aplicaciones terapéuticas de esta tecnología.

4. Discusión

La evidencia analizada demuestra que el sistema CRISPR-Cas ha reducido algunas limitaciones operativas presentes en plataformas previas como las meganucleasas, ZFNs y TALENs debido a su programación mediante ARN guía, elevada adaptabilidad y capacidad de multiplexación. Sin embargo, su transición desde aplicaciones experimentales hacia terapias clínicas continúa condicionada por desafíos relacionados con la genotoxicidad, inmunogenicidad y administración eficiente de los componentes moleculares. La edición basada en roturas de doble cadena (DSBs) continúa siendo una estrategia ampliamente utilizada, aunque la dependencia de mecanismos de reparación como NHEJ puede generar modificaciones no deseadas.

La reparación mediante NHEJ permite obtener inactivaciones génicas eficientes debido a su elevada actividad celular; no obstante, su naturaleza propensa a errores puede favorecer la generación de inserciones, deleciones, alteraciones cromosómicas y eventos genómicos inesperados. Además, la activación de mecanismos celulares de respuesta al daño del ADN, como la vía p53, representa una limitación relevante porque puede inducir senescencia o apoptosis y modificar la composición de las poblaciones celulares editadas. Por ello, la precisión de la edición constituye un factor determinante para la seguridad terapéutica.

En este contexto, las plataformas de edición sin roturas de doble cadena, como los editores de bases (*Base Editing*) y Prime Editing, representan avances relevantes al permitir modificaciones genéticas específicas mediante la integración de desaminasas o transcriptasas inversas asociadas a variantes modificadas de Cas9. Estas tecnologías disminuyen algunos riesgos asociados con las DSB; sin embargo, no eliminan completamente los problemas de especificidad. Los editores de bases pueden presentar modificaciones fuera del objetivo a nivel genómico y transcriptómico, mientras que Prime Editing enfrenta limitaciones relacionadas con su complejidad molecular y requerimientos de transporte.

Los resultados sugieren que la disponibilidad de herramientas de edición más precisas no garantiza por sí sola una aplicación clínica exitosa, debido a que la eficiencia terapéutica depende también de la capacidad para administrar estos sistemas hacia tejidos específicos. Los vectores virales, especialmente los AAV, ofrecen ventajas relacionadas con su capacidad de transducción y direccionamiento celular; sin embargo, sus restricciones de carga genética y la exposición prolongada a componentes CRISPR pueden limitar su seguridad en determinados escenarios terapéuticos.

Por otra parte, los sistemas no virales, como las nanopartículas lipídicas y los complejos ribonucleoproteicos (RNP), han demostrado ventajas asociadas con una expresión transitoria y menor riesgo de integración genómica, aunque todavía presentan desafíos relacionados con la estabilidad molecular, escape endosomal y distribución tisular. La acumulación preferencial de algunos vehículos

en órganos específicos, como el hígado, evidencia la necesidad de desarrollar estrategias de direccionamiento capaces de ampliar la aplicación de CRISPR-Cas hacia otros tejidos.

En consecuencia, la consolidación clínica de CRISPR-Cas requiere un enfoque integrado que combine nucleasas de mayor fidelidad, modificaciones químicas de ARN guía, sistemas de entrega biomiméticos y estrategias de reducción de la respuesta inmunitaria. La evidencia actual indica que el futuro de estas tecnologías no dependerá únicamente del perfeccionamiento de la maquinaria de edición, sino de la interacción coordinada entre precisión molecular, seguridad biológica y capacidad de transporte hacia células diana.

5. Conclusiones

En conclusión, el análisis integrado de las plataformas CRISPR-Cas evidencia que la transición desde los sistemas convencionales de edición genética hacia herramientas de precisión, como los editores de bases y Prime Editing, representa un avance significativo para reducir algunos riesgos asociados con las roturas de doble cadena y mejorar la especificidad de las modificaciones genómicas. Estas tecnologías han ampliado las posibilidades de intervención molecular al permitir correcciones más controladas y nuevas estrategias de regulación génica.

Sin embargo, los resultados analizados demuestran que la implementación clínica de CRISPR-Cas continúa condicionada por limitaciones relacionadas con la precisión del direccionamiento, la eficiencia de los sistemas de entrega, la aparición de efectos fuera del objetivo y la respuesta inmunológica del hospedador. Por ello, el desarrollo de variantes Cas de mayor fidelidad y vehículos de transporte más seguros constituye un requisito fundamental para mejorar la eficacia terapéutica.

En este sentido, la consolidación de CRISPR-Cas como una plataforma terapéutica ampliamente aplicable dependerá de la integración entre avances en ingeniería molecular, sistemas de liberación específicos y estrategias destinadas a controlar la interacción con el sistema inmunitario humano. La resolución progresiva de estas barreras permitirá trasladar de manera segura la versatilidad de esta tecnología desde los modelos experimentales hacia aplicaciones biomédicas dirigidas al tratamiento de enfermedades genéticas, infecciosas y otras patologías complejas.

Referencias

- Akbar, A., Haider, R., Agnello, L., Noor, B., Maqsood, N., Atif, F., Ali, W., Ciaccio, M., & Tariq, H. (2025). CRISPR in neurodegenerative diseases treatment: An alternative approach to current therapies. *Genes*, 16(8), 850. <https://doi.org/10.3390/genes16080850>
- Bhat, A., Nisar, S., Mukherjee, S., Saha, N., Yarravarapu, N., Lone, S., Masoodi, T., Chauhan, R., Maacha, S., Bagga, P., Dhawan, P., Akil, A., El-Rifai, W., Uddin, S., Reddy, R., Singh, M., Macha, M., & Haris, M. (2022). Integration of CRISPR/Cas9 with artificial intelligence for improved cancer therapeutics. *Journal of Translational Medicine*, 20(1), 534. <https://doi.org/10.1186/s12967-022-03765-1>
- Davis, D., & Yeddula, S. (2024). CRISPR advancements for human health. *Missouri Medicine*, 121(2), 170–176. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11057861/>
- Du, Y., Liu, Y., Hu, J., Peng, X., & Liu, Z. (2023). CRISPR/Cas9 systems: Delivery technologies and biomedical applications. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 18(6), 100854. <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2023.100854>

- El Ouar, I., & Djekoun, A. (2021). Therapeutic and diagnostic relevance of CRISPR technology. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 138, 111487. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111487>
- Kubikova, N., Keefe, D. L., Wells, D., Oktay, K. H., & Feinberg, E. C. (2023). Should we use CRISPR gene editing in human embryos? *Fertility and Sterility*, 120(4), 737–744. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2023.08.009>
- Lafi, Z., Ata, T., & Asha, S. (2025). CRISPR in clinical diagnostics: Bridging the gap between research and practice. *Bioanalysis*, 17(4), 281–290. <https://doi.org/10.1080/17576180.2025.2459520>
- Laurent, M., Geoffroy, M., Pavani, G., & Guiraud, S. (2024). CRISPR-based gene therapies: From preclinical to clinical treatments. *Cells*, 13(10), 800. <https://doi.org/10.3390/cells13100800>
- Lee, Y., Oh, Y., & Lee, S. H. (2024). Recent advances in genome engineering by CRISPR technology. *BMB Reports*, 57(1), 12–18. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10828434/>
- Li, C., Brant, E., Budak, H., & Zhang, B. (2021). CRISPR/Cas: A Nobel Prize award-winning precise genome editing technology for gene therapy and crop improvement. *Journal of Zhejiang University. Science. B*, 22(4), 253–284. <https://doi.org/10.1631/jzus.B2100009>
- Li, T., Yang, Y., Qi, H., Cui, W., Zhang, L., Fu, X., He, X., Liu, M., Li, P. F., & Yu, T. (2023). CRISPR/Cas9 therapeutics: Progress and prospects. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 8(1), 36. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01309-7>
- Liu, G., Lin, Q., Jin, S., & Gao, C. (2022). The CRISPR-Cas toolbox and gene editing technologies. *Molecular Cell*, 82(2), 333–347. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2021.12.002>
- Ma, Y., & Qi, L. (2024). The realization of CRISPR gene therapy. *Nature Chemical Biology*, 20(7), 791–795. <https://doi.org/10.1038/s41589-024-01645-x>
- Modell, A., Lim, D., Nguyen, T., Sreekanth, V., & Choudhary, A. (2022). CRISPR-based therapeutics: Current challenges and future applications. *Trends in Pharmacological Sciences*, 43(2), 151–161. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2021.10.012>
- Navarro, C., Díaz, M., Duran, P., Castro, A., Díaz, A., Cano, C., Carbonell-Zabaleta, A., Solano-Jimenez, D., Rivera-Porras, D., Contreras-Velásquez, J., & Bermúdez, V. (2025). CRISPR-Cas systems: A functional perspective and innovations. *International Journal of Molecular Sciences*, 26(8), 3645. <https://doi.org/10.3390/ijms26083645>
- Nidhi, S., Anand, U., Oleksak, P., Tripathi, P., Lal, J., Thomas, G., Kuca, K., & Tripathi, V. (2021). Novel CRISPR-Cas systems: An updated review of the current achievements, applications, and future research perspectives. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(7), 3327. <https://doi.org/10.3390/ijms22073327>
- Prasad, K., George, A., Ravi, N. S., & Mohankumar, K. M. (2021). CRISPR/Cas based gene editing: Marking a new era in medical science. *Molecular Biology Reports*, 48(5), 4879–4895. <https://doi.org/10.1007/s11033-021-06479-7>
- Sharma, G., Sharma, A. R., Bhattacharya, M., Lee, S. S., & Chakraborty, C. (2021). CRISPR-Cas9: A preclinical and clinical perspective for the treatment of human diseases. *Molecular Therapy*, 29(2), 571–586. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2020.09.028>
- Shojaei, S., Gardanova, Z., Abadi, S., Zaman, B., İlhan, A., Shomali, N., Adili, A., Moghaddar, R., & Yaseri, A. (2022). CRISPR/Cas9 application in cancer therapy: A pioneering genome editing tool. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 27(1), 35. <https://doi.org/10.1186/s11658-022-00336-6>

- Tyumentseva, M., Tyumentsev, A., & Akimkin, V. (2023). CRISPR/Cas9 landscape: Current state and future perspectives. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(22), 16077. <https://doi.org/10.3390/ijms242216077>
- Zhang, M., Eshraghian, E., Jammal, O., Zhang, Z., & Zhu, X. (2021). CRISPR technology: The engine that drives cancer therapy. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 133, 111007. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.111007>
- Zhang, X., Ma, D., & Liu, F. (2025). CRISPR technology and its emerging applications. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, 23(3), qzaf034. <https://doi.org/10.1093/gpbjnl/qzaf034>
- Zheng, R., Zhang, L., Parvin, R., Su, L., Chi, J., Shi, K., Ye, F., & Huang, X. (2023). Progress and perspective of CRISPR-Cas9 technology in translational medicine. *Advanced Science*, 10(25), e2300195. <https://doi.org/10.1002/advs.202300195>

Transparencia

Conflicto de interés

La autora declara que no existen conflictos de interés de naturaleza alguna como parte de la presente investigación.

Fuente de financiamiento

La autora financia completamente la investigación.

Declaración sobre el uso de Inteligencia Artificial (IA)

La autora declara explícitamente el uso de la herramienta de inteligencia artificial Gemini (Google) durante la elaboración del manuscrito. Su empleo se limitó exclusivamente al apoyo técnico, la organización de ideas, la revisión lingüística, la corrección de la redacción y el pulido del flujo narrativo, así como a la traducción técnico-lingüística del resumen (abstract). Se confirma de manera categórica que la IA no se utilizó para generar contenido científico del manuscrito, formular argumentos, elaborar resultados, interpretar hallazgos ni reemplazar el juicio científico de la autora. Toda la revisión bibliográfica, el análisis crítico y la integración teórica fueron realizadas íntegramente por la autora, quien asume la total responsabilidad de mantener la integridad y veracidad del contenido presentado en este trabajo.

Contribución de autoría

Gabriela Salomé Morales Ramos: Conceptualización, metodología, software, validación, análisis formal, investigación, gestión de datos, visualización, redacción - preparación del borrador original, redacción - revisión y edición, financiamiento, administración del proyecto, recursos, supervisión.

La autora intervino de manera activa en el análisis de los resultados, revisión y aprobación del texto final del artículo.