



**INSTITUTO LATINOAMERICANO DE
CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA
NATURALEZA (ILACVN)**

BIOTECNOLOGÍA

**SISTEMAS CRISPR-CAS: DIVERSIDAD ESTRUCTURAL, MECANISMOS
ENDÓGENOS Y POTENCIALES BIOTECNOLÓGICOS**

LEONARDO RUIZ MONTANIA

Foz do Iguaçu
2025



**INSTITUTO LATINOAMERICANO DE CIENCIAS DE
LA VIDA Y DE LA NATURALEZA (ILACVN)**

BIOTECNOLOGÍA

**SISTEMAS CRISPR-CAS: DIVERSIDAD ESTRUCTURAL, MECANISMOS
ENDÓGENOS Y POTENCIALES BIOTECNOLÓGICOS**

LEONARDO RUIZ MONTANIA

Trabajo de Conclusión de Curso presentado al Instituto Latinoamericano de Ciencias de la Vida y de la Naturaleza de la Universidad Federal de la Integración Latinoamericana, como requisito parcial para la obtención del título de Bachiller en Biotecnología.

Orientador: Prof. Dr. Cristian Antonio Rojas
Co-orientadora: B.Sc. María Esther Vivanco Suazo

Foz do Iguaçu
2025

LEONARDO RUIZ MONTANIA

TÍTULO DEL TRABAJO:

SISTEMAS CRISPR-CAS: DIVERSIDAD ESTRUCTURAL, MECANISMOS
ENDÓGENOS Y POTENCIALES BIOTECNOLÓGICOS

Trabajo de Conclusión de Curso presentado al Instituto Latinoamericano de Ciencias de la Vida y de la Naturaleza de la Universidad Federal de la Integración Latinoamericana, como requisito parcial para la obtención del título de Bachiller en Biotecnología.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Cristian Antonio Rojas
UNILA

Prof. Dr. Jorge Luis Maria Ruiz
UNILA

Prof. Dr. Walfrido Kuhl Svoboda
UNILA

Foz do Iguaçu, 12 de diciembre de 2025.

AGRADECIMIENTOS

La realización de este trabajo determina el final de una etapa de formación académica, a la cual no hubiera sido posible llegar sin el apoyo de muchas personas que me sostuvieron a lo largo de este camino recorrido. En primer lugar quisiera agradecer a mis padres, los cuales construyeron y continúan construyendo una gran parte de mi persona. Gracias a ellos y su esfuerzo pude conseguir este logro y reconocer que este pertenece a Aquel que primero pensó en mí y en mi destino. Además quisiera agradecer a mis tíos que me dieron un segundo hogar y permitieron mi adaptación a la vida en Ciudad del Este y Foz de Iguazú, la cual fue crucial para llevar a término esta etapa.

También agradezco a mis amigos y compañeros de facultad, con los cuales vivimos penas y alegrías universitarias que permitieron mi crecimiento, demostrándome que la vida profesional va más allá del estudio y trabajo, sino que posee un carácter humano que debe ser tenido en cuenta.

Especialmente agradezco a mi orientador y coordinadora, que con una paciencia infinita y una disponibilidad inmensa me acompañaron y guiaron en el proceso (a veces tumultuoso) de elaboración de este trabajo y de formación profesional.

Por último quisiera agradecer a la UNILA, que me brindó la oportunidad de seguir una formación académica superior, brindando las instalaciones y financiación adecuada, esta última mediante el programa de apoyo a Trabajo de Conclusión de Curso.

RESUMO

A descoberta dos sistemas CRISPR-Cas impulsionou o desenvolvimento de ferramentas avançadas para edição genética e detecção de ácidos nucleicos, transformando profundamente os procedimentos de engenharia celular e metabólica e abrindo novas possibilidades na biotecnologia moderna. Este trabalho descreve em detalhe os sistemas imunológicos procariotos CRISPR-Cas, considerando sua diversidade estrutural e funcional, bem como sua classificação filogenética e evolutiva. São apresentados os mecanismos de ação correspondentes aos módulos de adaptação, expressão e interferência, destacando como essas etapas coordenadas permitem o reconhecimento, o processamento e a eliminação de material genético exógeno. Além disso, aprofunda-se a análise das proteínas Cas envolvidas na defesa CRISPR, com uma descrição de suas funções, domínios estruturais e particularidades mecanísticas que determinam a especificidade e a eficiência de cada sistema. O trabalho também aborda as aplicações biotecnológicas derivadas dos diferentes tipos e subtipos de CRISPR-Cas, evidenciando seu impacto na melhoria de cultivos, no desenvolvimento de novas terapias gênicas e celulares e na implementação de plataformas de diagnóstico molecular de alta sensibilidade. Revisam-se ainda as variantes descobertas nos últimos anos, analisando seu potencial para expandir o repertório de ferramentas de edição e detecção. Essas inovações são discutidas no contexto de sua possível origem evolutiva, relacionando-as a mecanismos ancestrais associados a elementos genéticos móveis e à dinâmica evolutiva dos procariotos. Por fim, examina-se como os avanços paralelos em bioinformática, genômica e análise estrutural têm acompanhado e potencializado o desenvolvimento de tecnologias derivadas de CRISPR, permitindo uma caracterização mais precisa de novas proteínas Cas e aprimorando o desenho racional de sistemas de edição. O resumo conclui com uma reflexão sobre os desafios éticos, regulatórios e legais associados à adoção generalizada dessas tecnologias, ressaltando a importância de seu uso responsável e de um marco normativo adequado.

Palavras-chave: CRISPR-Cas; edição genética; defesa bacteriana; aplicações biotecnológicas; proteínas Cas.

RESUMEN

El descubrimiento de los sistemas CRISPR-Cas impulsó el desarrollo de herramientas avanzadas para la edición genética y la detección de ácidos nucleicos, transformando profundamente los procedimientos de ingeniería celular y metabólica, abriendo nuevas posibilidades en biotecnología moderna. En este trabajo se describen en detalle los sistemas inmunológicos procariontes CRISPR-Cas, atendiendo a su diversidad estructural y funcional, así como a su clasificación filogenética y evolutiva. Se exponen los mecanismos de acción correspondientes a los módulos de adaptación, expresión e interferencia, enfatizando cómo estas etapas coordinadas permiten el reconocimiento, procesamiento y eliminación de material genético exógeno. Asimismo, se profundiza en las proteínas Cas implicadas en la defensa CRISPR, con una descripción de sus funciones, dominios estructurales y particularidades mecánicas que determinan la especificidad y eficiencia de cada sistema. El trabajo también aborda las aplicaciones biotecnológicas derivadas de los distintos tipos y subtipos de CRISPR-Cas, destacando su impacto en la mejora de cultivos, el desarrollo de nuevas terapias génicas y celulares, y la implementación de plataformas de diagnóstico molecular de alta sensibilidad. Se revisan además las variantes descubiertas en los últimos años, analizando su potencial para expandir el repertorio de herramientas de edición y detección. Estas innovaciones se discuten en el marco de su posible origen evolutivo, relacionándolas con mecanismos ancestrales vinculados a elementos genéticos móviles y con la dinámica evolutiva de los procariontes. Finalmente, se examina cómo los avances paralelos en bioinformática, genómica y análisis estructural han acompañado y potenciado el desarrollo de tecnologías derivadas de CRISPR, permitiendo una caracterización más precisa de nuevas proteínas Cas y mejorando el diseño racional de sistemas de edición. El resumen concluye con una reflexión sobre los desafíos éticos, regulatorios y legales asociados a la adopción generalizada de estas tecnologías, subrayando la importancia de su uso responsable y de un marco normativo adecuado.

Palabras clave: CRISPR-Cas; edición genética; defensa bacteriana; aplicaciones biotecnológicas; proteínas Cas.

ABSTRACT

The discovery of CRISPR-Cas systems drove the development of advanced tools for genome editing and nucleic acid detection, profoundly transforming cellular and metabolic engineering procedures and opening new possibilities in modern biotechnology. This work provides a detailed description of prokaryotic CRISPR-Cas immune systems, addressing their structural and functional diversity as well as their phylogenetic and evolutionary classification. The mechanisms of action corresponding to the adaptation, expression, and interference modules are presented, emphasizing how these coordinated stages enable the recognition, processing, and elimination of foreign genetic material. Further attention is given to Cas proteins involved in CRISPR defense, including a description of their functions, structural domains, and mechanistic particularities that determine the specificity and efficiency of each system. The study also discusses the biotechnological applications derived from the different CRISPR-Cas types and subtypes, highlighting their impact on crop improvement, the development of new gene and cell therapies, and the implementation of high-sensitivity molecular diagnostic platforms. Recent variants discovered in the last years are reviewed, analyzing their potential to expand the repertoire of editing and detection tools. These innovations are examined within the framework of their possible evolutionary origins, linking them to ancestral mechanisms associated with mobile genetic elements and to the evolutionary dynamics of prokaryotes. Finally, the work explores how parallel advances in bioinformatics, genomics, and structural analysis have supported and enhanced the development of CRISPR-derived technologies, enabling more precise characterization of novel Cas proteins and improving the rational design of editing systems. The summary concludes with a reflection on the ethical, regulatory, and legal challenges associated with the widespread adoption of these technologies, underscoring the importance of responsible use and an appropriate regulatory framework.

Key words: CRISPR-Cas; genome editing; bacterial defense; biotechnological applications; Cas proteins.

LISTA DE IMÁGENES

Imagen 1 – Mecanismo de defensa por CRISPR-Cas.....	18
Imagen 2 – Clasificación de los sistemas CRISPR-Cas.....	26
Imagen 3 – Mecanismo de adaptación observado en los sistemas CRISPR de tipo I.....	28
Imagen 4 – Complejo de interferencia observado en los sistemas CRISPR de tipo I.....	29
Imagen 5 – Mecanismo de interferencia encontrado en el sistema CRISPR de tipo III.....	32
Imagen 6 – Procesamiento del pre-crRNA en los sistemas CRISPR de tipo II.....	38
Imagen 7 – Estructura del complejo efector de los sistemas CRISPR de tipo II y mecanismo de corte.....	39
Imagen 8 – Estructura del complejo efector del sistema CRISPR de tipo V y mecanismo de corte.	43
Imagen 9 – Mecanismo de detección de ácidos nucleicos por la técnica DETECTR.....	45
Imagen 10 – Aplicaciones de Cas13.....	48
Imagen 11 – Mecanismo de detección de ácidos nucleicos por la metodología SHERLOCK.....	50
Imagen 12 – Estructura del complejo efector del sistema CRISPR de tipo VII y del heteroduplex crRNA-RNA objetivo formado.....	51
Imagen 13 – Mecanismos de evasión a CRISPR.....	52
Imagen 14 – Mecanismos de evasión a CRISPR mediados por proteínas anti-CRISPR.....	54
Imagen 15 – Relación evolutiva y orígenes de los sistemas CRISPR de clase 1.....	58
Imagen 16 – Relación evolutiva y orígenes de los sistemas CRISPR de clase 2.....	60
Imagen 17 – Diferentes formas de hallar variantes mejoradas de las proteínas Cas.....	62
Imagen 18 – Mecanismos de reparación por recombinación homóloga (HDR) y unión de extremos no homólogos (NHEJ).....	64
Imagen 19 – Aplicaciones de Cas9 en el contexto de la edición y regulación génica.....	66
Imagen 20 – Aplicaciones de dCas.....	68

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1 – Proteínas Cas principales del sistema CRISPR-Cas.....	20
Cuadro 2 – Resumen de aplicaciones biotecnológicas de los tipos de sistemas CRISP..	71

LISTA DE ABREVIATURAS Y SIGLAS

Acr	Anti-CRISPR
CRISPR	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i> (Repeticiones Palindrómicas Cortas Agrupadas y Regularmente Espaciadas)
Cas	CRISPR associated (asociado a CRISPR)
CASCADE	<i>CRISPR-associated complex for antiviral defense</i> (complejo asociado a CRISPR para defensa antiviral)
cOA	Oligoadenilados cíclicos
crRNA	RNA CRISPR
DNA	<i>Desoxiribonucleic acid</i> (ácido desoxirribonucleico).
DSB	<i>Double-strand break</i> (ruptura de doble cadena)
dsDNA	<i>double-stranded DNA</i> (DNA de doble cadena)
dsRNA	<i>double-stranded RNA</i> (RNA de doble cadena)
EGM	Elementos genéticos móviles
gRNA	RNA guía
HDR	<i>Homology-directed repair</i> (reparación dirigida por homología)
iRNA	RNA de interferencia
NHEJ	<i>Non-homologous DNA end joining</i> (unión de extremos no homólogos)
PAM	<i>protospacer-adjacent motif</i> (motivo adyacente al protoespaciador)
PI	<i>PAM-interacting</i> (interacción con PAM)
RRM	<i>RNA recognition motif</i> (motivo de reconocimiento de RNA)
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (ácido ribonucleico)
RT	Retrotranscriptasa
sgRNA	RNA de guía simple
ssDNA	<i>single-stranded DNA</i> (DNA de cadena simple)
ssRNA	<i>single-stranded RNA</i> (RNA de cadena simple)
TGH	Transferencia genética horizontal

SUMÁRIO

1 INTRODUCCIÓN	12
2 DESARROLLO	17
2.1 COMPONENTES DEL SISTEMA CRISPR-CAS.....	17
2.1.1 Locus CRISPR.....	18
2.1.2 Genes cas.....	19
2.1.3 crRNA y tracrRNA.....	22
2.2 MECANISMO DE DEFENSA ENDÓGENO.....	23
2.2.1 Adaptación (integración de espaciadores).....	23
2.2.2 Expresión y maduración del pre-crRNA (biogénesis del crRNA).....	23
2.2.3 Interferencia (corte de DNA o RNA invasor).....	24
2.3 CLASIFICACIÓN GENERAL DE LOS SISTEMAS CRISPR.....	25
2.3.1 Clase 1: complejos multiproteicos (tipos I, III e IV).....	26
2.3.1.1 Tipo I.....	27
2.3.1.2 Tipo III.....	31
2.3.1.3 Tipo IV.....	35
2.3.2 Clase 2: proteína única multifuncional (tipos II, V e VI).....	36
2.3.2.1 Tipo II.....	36
2.3.2.2 Tipo V.....	41
2.3.2.3 Tipo VI.....	46
2.3.3 Sistemas Emergentes Y Variantes Recientes.....	50
2.3.3.1 Tipo VII.....	50
2.3.3.3 Sistemas anti-CRISPR.....	51
2.4 DISCUSIÓN EVOLUTIVA: PROBABLE ORIGEN EN LOS SISTEMAS DE DEFENSA Y TRANSPOSICIÓN HORIZONTAL DE ELEMENTOS CAS.....	54
2.5 TENDENCIAS ACTUALES: MINIATURIZACIÓN Y ESPECIFICIDAD AUMENTADA.....	60
2.6 APLICACIONES EMERGENTES.....	62
2.7. DESAFÍOS Y PERSPECTIVAS FUTURAS.....	69
3 CONSIDERACIONES FINALES	73
REFERENCIAS	74

1 INTRODUCCIÓN

La historia del ser humano ha estado marcada por grandes acontecimientos que permitieron cambios de paradigma en la sociedad, que son impulsados por la capacidad del ser humano en percibir su entorno y la realidad que lo rodea. De esta capacidad nacen varios comportamientos que moldean este avance de la historia: desde el deseo de justicia frente a escenarios de opresión que luego introducen ideas como la ética y la moral, hasta el espíritu artístico y creativo que permitió el desarrollo de las grandes obras en el campo de la música y la pintura. Entre los motores de conocimiento y creación que tiene el ser humano se encuentra la curiosidad, la cual es la impulsa el avance científico, a través de la construcción de conocimiento nuevo.

De esta curiosidad surgen preguntas que dictan el camino del avance científico y tecnológico. Una de las cuestiones que siempre fue del interés humano fue determinar el concepto de ser vivo y las características que estos presentan para ser considerados como tal. El estudio de la biología, y específicamente de la sistemática, permitió la agrupación de condiciones que separan lo biótico de lo abiótico. De esta forma, fueron explorados los límites que permitieran a los seres vivos su subsistencia, pudiéndose encontrar formas de vida en prácticamente todos los lugares del planeta. El avance de herramientas tecnológicas capaces de ampliar los límites de la visión humana hizo posible el descubrimiento de las formas de vida más simples y primitivas: los microorganismos, los cuales con los avances de la biología celular fueron agrupados según características similares. De allí junto con otras técnicas de estudio surge la clasificación taxonómica actual de los seres vivos, la cual tiene como mayor división superior a los dominios biológicos. Los dominios separan a los seres vivos según la presencia o no de la estructura del núcleo celular, el cual permite el almacenamiento y compartimentalización del material genético. Aquellos organismos que no presentan núcleo pertenecen al grupo Prokarya, que se distribuye en dos dominios: Bacteria y Archaea (MADIGAN et al., 2016). Estos dominios presentan la mayor diversidad y cantidad de organismos vivos, lo que permite encontrar variedad de ellos que beneficien al ser humano. Las especies bacterianas nombradas al día de presente trabajo son aproximadamente 107 200, mientras que las arqueas conocidas son en torno a 5 800 especies descritas (SQUARTINI, 2025).

Se estima que los organismos procariotas surgieron hace 3900 millones de años atrás (BETTS et al., 2018), y desde los primeros momentos de su existencia

estuvieron expuestos a presiones adaptativas y selectivas que moldearon los genomas de estos organismos, permitiendo la evolución y surgimiento de las especies. Entre los diferentes factores de selectividad microbiana se encuentran los elementos genéticos móviles (EGM), los cuales se estima que se originaron en un periodo evolutivo muy temprano (FROST et al., 2005). Entre los EGM más representativos se encuentran los virus, plásmidos y transposones. Un virus es un pequeño agente infeccioso que solo puede multiplicarse dentro de células vivas, apropiándose de la maquinaria celular del hospedador para producir más partículas virales. Los virus consisten en material genético (ya sea DNA o RNA) encerrado en una cápside proteica y, a veces, en una envoltura lipídica adicional. Son parásitos intracelulares obligados, lo que significa que no pueden replicarse de manera independiente fuera de una célula hospedadora. La partícula viral completa se denomina virión (KONIN et al., 2021). Por otro lado los transposones, también conocidos como elementos transponibles, son segmentos de DNA que pueden moverse de un lugar a otro dentro de un genoma. Este movimiento, llamado transposición, es facilitado por enzimas (transposasas) que a menudo son codificadas por el propio transposón. Los transposones pueden interrumpir genes, alterar la expresión génica y contribuir a la evolución del genoma (HICKMAN; DYDA, 2016). Otro EGM muy difundido son los plásmidos, los cuales son moléculas de DNA circular de doble cadena, que existen de manera independiente del DNA cromosómico en células procariontas. Estos se replican de forma autónoma y a menudo portan genes que confieren características ventajosas, como la resistencia a antibióticos (WEIN; DAGAN, 2020). Desempeñan un papel importante en la transferencia horizontal de genes y en la evolución microbiana, y se utilizan ampliamente como vectores en ingeniería genética (TOKUDA; SHINTANI, 2024).

La evolución presenta un carácter competitivo, en el cual las especies van presentando características y cualidades que les permiten tener ventaja frente a otros organismos con relaciones ecológicas negativas, como la depredación y el parasitismo (PASTORE et al., 2021). En este sentido, el constante ataque de virus y otros EGM a las bacterias y arqueas, permitió que estas desarrollen diversas estrategias moleculares que impidan una invasión exitosa de esas secuencias en el genoma microbiano. Muchas de ellas impiden de manera general la internalización y avance de los ciclos infecciosos de estos elementos, las cuales podrían ser comparadas con el sistema inmunitario innato de los vertebrados y organismos superiores. Algunas de estas estrategias son la presencia de enzimas de restricción, modificaciones superficiales y mecanismos abortivos

(MAYO-MUÑOZ et al., 2023). Sin embargo, cuando luego de un ataque no exitoso se genera una memoria que permita lidiar de manera más rápida con subsecuentes infecciones del mismo tipo, se puede decir que existe un sistema inmunológico adaptativo (RATH et al., 2015).

A diferencia del sistema inmune adaptativo de los mamíferos (el cual presenta un gran complejidad e involucramiento de varios órganos y tipos celulares), el sistema adaptativo bacteriano tiene mayor simpleza, pero de igual forma una complejidad molecular importante. A este sistema se le denomina CRISPR-Cas (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats and CRISPR associated*; Repeticiones Palindrómicas Cortas Agrupadas y Regularmente Espaciadas y asociado a CRISPR) (HILLE et al., 2018), siendo observado uno de sus elementos en la mitad de la década de 1980. Y. Ishino estaba estudiando la conversión de la fosfatasa alcalina en una de sus isoenzimas, cuando observó que una secuencia genética aparecía muchas veces en clones diferentes de *Escherichia Coli*, corriente abajo del gen de la fosfatasa alcalina (*iap*). Esas secuencias eran complicadas de ser leídas debido a la terminación no específica de reacciones de lectura del secuenciamiento dideoxi M13. Esa finalización prematura se debía a la presencia de secuencias palindrómicas de DNA que forman estructuras secundarias que impiden la terminación normal de la reacción, y de las cuales no se conocía su función. Estas regiones fueron denominadas secuencias palindrómicas extragénicas repetitivas, y posteriormente fueron halladas otras secuencias similares en otras especies bacterianas como *Mycobacterium tuberculosis* y *M. leprae*. Estas regiones al ser altamente polimórficas permitían la caracterización de las cepas microbianas (ISHINO et. al., 2018).

La identificación de secuencias repetitivas similares en arqueas halófilas por Mojica y colaboradores en 1993 permitió un avance en el entendimiento de la función de estos elementos. Fue sugerido que estas repeticiones podrían estar involucradas en la regulación de la expresión génica, permitiendo la conversión de la hélice de DNA del tipo B al Z, lo que permite la estabilización de la molécula en un ambiente hipertónico (MOJICA; JUEZ; RODRÍGUEZ-VALERA, 1993). Mientras tanto, el desarrollo de técnicas de secuenciamiento automatizadas permitió el acceso a genomas enteros, lo que aumentó los hallazgos de estas repeticiones inusuales, generando la utilización de diferentes terminologías para describirlas. Sin embargo, Mojica y colaboradores fueron los primeros en darse cuenta de la semejanza funcional de estas secuencias entre bacterias y arqueas (MOJICA et al., 2000). En 2002 fue propuesto el término “CRISPR” para

denominar a dichas secuencias, el cual fue bien recibido por la comunidad científica (JANSEN et al., 2002). Además empezaron a notarse las características compartidas de estas regiones, como la localización intergénica, presencia de repeticiones con muy baja variación nucleotídica, presencia de regiones no conservadas entre estas repeticiones y la presencia de una secuencia denominada “*leader*”, presente en alguno de los extremos del conjunto (ISHINO ET. AL., 2018). Adicionalmente, mediante el aumento de genomas en los bancos de datos y la comparación entre ellos permitió el descubrimiento de 4 genes conservados adyacentes a la región CRISPR, los cuales fueron asociados a las proteínas asociadas a CRISPR (Cas), en los cuales fueron identificados dominios con función exonucleasa, polimerasa y helicasa, siendo por tanto asociados a la recombinación y reparación del DNA.

En 2005 ocurrió un hallazgo importante, documentado por dos laboratorios independientes, en el que se relaciona las secuencias no conservadas de la región CRISPR con secuencias homólogas a bacteriofagos, hipotetizando que la presencia de esas secuencias impedía la infección por aquellos virus específicos. La integración de estas secuencias debía ocurrir en algún momento de los ataques, lo que permitía generar una memoria molecular. Esto luego fue confirmado por Bolotin y colaboradores ese mismo año, y sugirieron que la región CRISPR podría generar RNAs antisentido, con función similar al sistema de iRNA (BOLOTIN et al., 2005). Sin embargo, el rol del sistema CRISPR-Cas fue demostrado solo en el 2007, en el que se observó la resistencia de una cepa bacteriana a la infección por bacteriofagos mediante la introducción de regiones inter repeticiones (denominadas “*spacers*”), con secuencias pertenecientes al bacteriofago en cuestión. Además se confirmó que la eliminación de estas secuencias generaba nuevamente la susceptibilidad al virus (BARRANGOU et al., 2007). Más adelante, van der Oost y colaboradores demostraron que el RNA generado de la transcripción de la región CRISPR era procesado por genes localizados en las cercanías de esta (BROUNS et al., 2008).

La cantidad de estudios sobre la región CRISPR y sus asociados creció significativamente en los años siguientes. Uno de los trabajos que llevó al desarrollo de las aplicaciones biotecnológicas del sistema CRISPR fue estudio de este sistema en la especie bacteriana *Streptococcus thermophilus* reveló que la presencia de una única proteína necesaria para permitir la defensa en este sistema: la Cas9, la cual requiere de una guía de RNA para ejecutar su función (crRNA). Posteriormente fue confirmado que este complejo es el encargado de digerir la secuencia objetivo *in vitro* (GRNAEU et al.,

2010). A partir de la observación la generación de cortes dirigidos en el DNA, algunos científicos se plantearon la idea de utilizar los componentes de este sistema para la sustitución de herramientas de edición genética contemporáneos que presentaban un gran esfuerzo en el diseño y dificultad en la implementación, como los son las meganucleasas, las nucleasas de dedos de zinc y nucleasas efectoras tipo activador de la transcripción (TALEN). Entre los años 2012 y 2013, se diseñaron las primeras adaptaciones de CRISPR-Cas9 para la edición genética en células eucariotas, abriendo una ventana de posibilidades que posteriormente permitiría el desarrollo de herramientas de diagnóstico, tratamiento clínico, mejoramiento genético, entre muchas otras áreas de conocimiento (CONG et al., 2013).

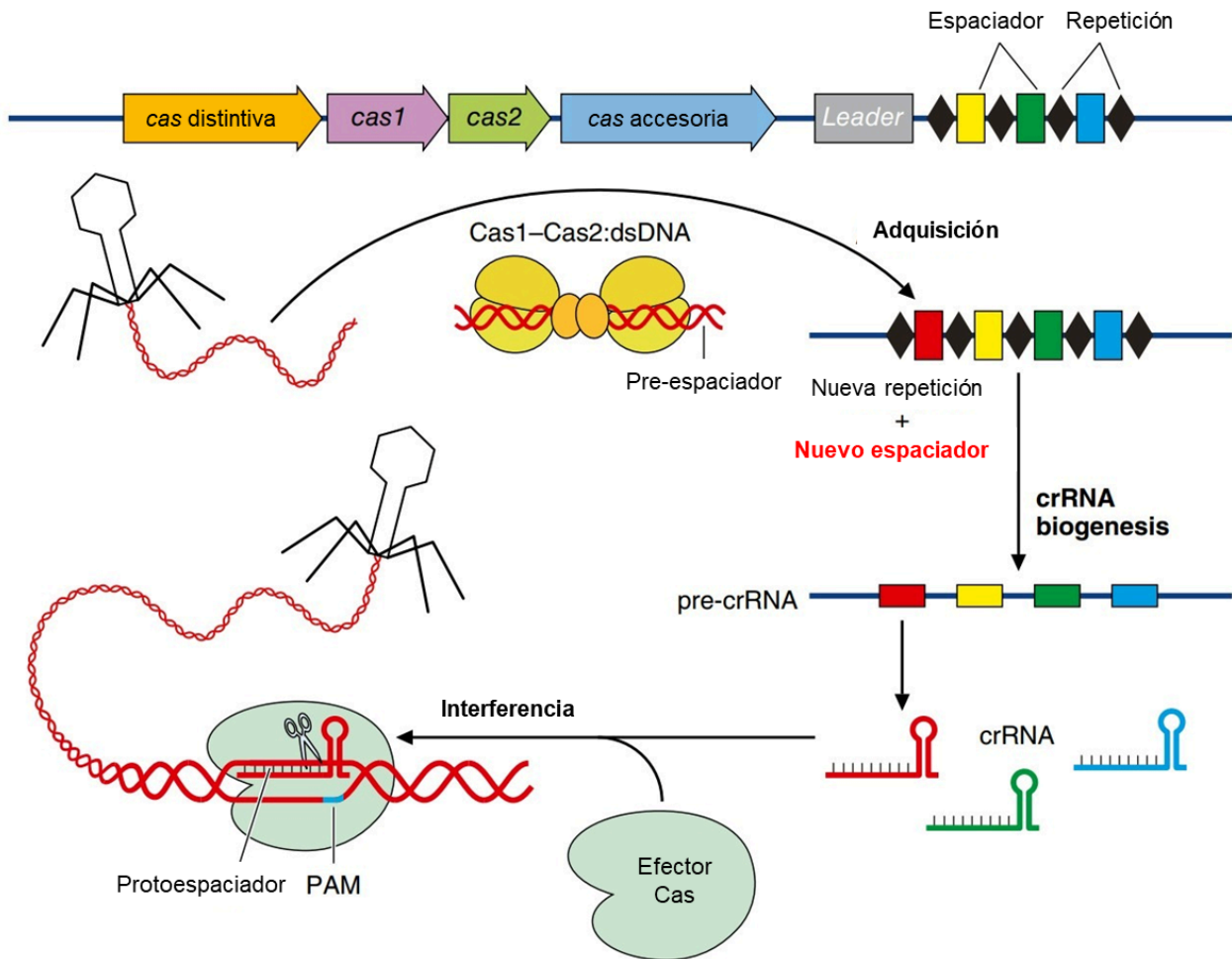
Por lo tanto, el objetivo de este trabajo es presentar de manera integral la estructura, la función endógena y las aplicaciones potenciales de todos los sistemas CRISPR-Cas conocidos, incluidos aquellos descubiertos más recientemente.

2 DESARROLLO

2.1 COMPONENTES DEL SISTEMA CRISPR-CAS

En el mecanismo de defensa CRISPR-Cas están involucradas proteínas asociadas a CRISPR (proteínas Cas), los RNA no codificantes y las proteínas auxiliares (las cuales serán mencionadas en las secciones más adelante). Este sistema contiene tres etapas: la adaptación, la expresión y la interferencia (Imagen 1). En la primera etapa un complejo ribonucleoproteico Cas se une a un DNA objetivo (que podría ser de un agente invasor como un virus), el cual es reconocido por una secuencia corta de nucleótidos denominada PAM (del inglés *protospacer-adjacent motif*, motivo adyacente al protoespaciador), lo que produce un corte y genera una secuencia corta de DNA denominada protoespaciador. Esta secuencia es introducida dentro de una región del genoma bacteriano denominada arreglo CRISPR, compuesto por secuencias repetitivas y no repetitivas. La incorporación es mediada por un complejo formado por dos tipos de proteínas (Cas1 y Cas2) que introducen el protoespaciador en la cadena líder, pasando a denominarse espaciador. El espaciador se incorpora adyacentemente a una región repetitiva que debió ser previamente duplicada. Posteriormente ocurre la etapa de la expresión, también llamada biogénesis del RNA CRISPR, que consiste en la transcripción del arreglo CRISPR para formar un pre-crRNA, que luego es procesado en las regiones repetitivas para generar los crRNAs. Por último ocurre la etapa de interferencia, la cual es mediada por un complejo multiproteico o por una proteína de dominio único. En esta etapa el crRNA generado es utilizado como guía por otra proteína CAS para reconocer secuencias idénticas o muy semejantes (como virus o plásmidos) a la secuencia del espaciador (proceso mediado por complementariedad de bases del espaciador y reconocimiento de sitios PAM). Una vez encontrada una coincidencia ocurre el corte e inactivación de la secuencia objetivo (NIDHI et al., 2021; MAKAROVA et al., 2020).

Imagen 1 – Mecanismo de defensa por CRISPR-Cas.



Fuente: Adaptado de BARRANGOU; MARRAFFINI; SONTHEIMER, 2022

Nota: El arreglo CRISPR típico contiene la matriz de repeticiones y *espaciador*, flanqueada por genes *cas*. Entre ellos están *cas1* y *cas2*, conservados casi universalmente y responsables de la adquisición de nuevos *espaciadores*. Otros genes *cas* definen el tipo de sistema y participan en la biogénesis del crRNA y en la etapa de interferencia. Durante la adquisición, fragmentos cortos del DNA invasor se integran en la matriz CRISPR, acompañados por la duplicación de la repetición. En la biogénesis del crRNA, la matriz se transcribe y procesa en pequeños crRNAs, que luego guían al complejo efector hacia su secuencia diana. En los sistemas de tipos I, II y V, el crRNA reconoce DNA complementario adyacente a un motivo PAM. En los tipos III y VI, el complejo efector usa el crRNA para dirigirse a RNA complementario del invasor.

2.1.1 Locus CRISPR

El arreglo CRISPR está conformado por varios elementos que permiten su correcta función. Corriente arriba de la primera secuencia repetitiva se encuentra el *leader*, el cual es una región donde se encuentran los promotores CRISPR y permite la correcta adquisición de nuevos espaciadores, de modo a que estos se ubiquen más cerca

del *leader*. Esta secuencia no suele estar conservada entre organismos de la misma especie. Luego se encuentran las secuencias repetición-espaciador. Las repeticiones normalmente tienen entre 23 a 55 pares de bases, aunque es más común encontrar repeticiones de 25, 28 y 36 pares de bases, y en el genoma de una especie se encuentran altamente conservadas. La mayoría de bacterias presentan repeticiones las cuales poseen secuencias complementarias internas, de modo que al ser traducidas el pre-crRNA forma un bucle, lo que ayuda a determinar los sitios de procesamiento. Los espaciadores normalmente son similares en tamaño, variando unos pocos nucleótidos y teniendo una longitud entre 32 y 37 nucleótidos de longitud. Las secuencias de los espaciadores son altamente variables entre diferentes cepas, e indicarían un potencial registro cronológico de elementos genéticos invasores. Existe cierta evidencia de dinamismo en el contenido de espaciadores, en el que a medida que son añadidas nuevas secuencias se remueven las más viejas. Este mecanismo permitiría la viabilidad del sistema CRISPR en la célula hospedera (MOJICA et al., 2013).

2.1.2 Genes *cas*

En relación a las proteínas Cas, no existen genes relacionados a ellas compartidos por todos los sistemas CRISPR-Cas, pero existen algunos que son más abundantes. Para la etapa de adaptación, las enzimas responsables por insertar el protoespaciador dentro del arreglo CRISPR son la Cas1 (con función integrasa) y la Cas2 (nucleasa generalmente inactivada con función estructural), las cuales son las más difundidas. Además de ellas pueden estar presentes la nucleasa Cas4 (exonucleasa ssDNA), Csn2 o una transcriptasa reversa (en algunos sistemas tipo III). En la etapa de expresión se encuentran involucradas las proteínas de procesamiento. En la mayoría de los tipos I, la Cas6 es la responsable de esta actividad. En el tipo II, el procesamiento se realiza por la RNasa III bacteriana (la cual se encuentra fuera del arreglo CRISPR), mientras que en los tipos V y VI el procesamiento ocurre debido a la acción de una única proteína CAS con múltiples dominios, encargada igualmente de las etapas sucesivas (Cas12 y Cas13 respectivamente). En la etapa de interferencia (también denominada módulo efector), el reconocimiento y escisión de ácidos nucleicos en la clase 1 involucra la presencia de las proteínas Cas3, Cas5 (con dominio de unión al extremo 5' del crRNA), Cas 7 (con dominio de unión al crRNA y en algunos sistemas con función ribonucleasa),

Cas8 (involucrada en el reconocimiento a PAM), Cas10 (subunidad grande con actividad polimerasa, ciclase y nucleasa) y Cas11 (subunidad pequeña que interactúa con el crRNA), en diferentes combinaciones dependiendo del tipo y subtipo. En contraparte, el módulo efector en la clase 2 es representado por una única proteína: Cas9, Cas12 o Cas13 dependiendo del tipo de sistema (BHATIA; SHUKLA; YADAV, 2023).

Cuadro 1 – Proteínas Cas principales del sistema CRISPR-Cas.

Familia	Función y estructura
Cas1	Desoxirribonucleasa dependiente de metal que funciona como integrasa durante la adaptación. Normalmente forma complejo con Cas2. Presenta dos dominios: un dominio N-terminal tipo lámina β y un dominio C-terminal tipo hélice α catalítica.
Cas2	Algunas son RNAsas específicas de U-rich, otras son desoxirribonucleasas bicatenarias, pero algunas están inactivadas. Forman un complejo estrecho con Cas1 y parecen proporcionar una estructura para la adaptación. Pertenecen a la superfamilia de dominios RRM (ferredoxina).
Cas3	Nucleasa de ssDNA dependiente de metal (dominio HD) y helicasa; necesaria para la interferencia en sistemas de tipo I. En algunos sistemas los dominios están separados (Cas3' helicasa y Cas3" HD).
Cas4	Nucleasa de la superfamilia PD-(D/E)xK con cuatro cisteínas conservadas coordinando un centro [4Fe-4S] o [2Fe-2S]; corta ssDNA en dirección 5'→3'. Asiste en la selección del protoespaciador y reconocimiento del PAM.
Cas5	Subunidad del complejo CASCADE que interactúa con la subunidad grande y con Cas7, y se une al extremo 5' del crRNA. En el subtipo I-C, Cas5 es la ribonucleasa activa que reemplaza la función de Cas6. Posee dos dominios RRM (ferredoxina). En algunos sistemas tipo III el dominio C-terminal está deteriorado y no se une al RNA.

Cas6	Endorribonucleasa dependiente de metal que genera crRNAs. Contiene dos dominios RRM (ferredoxina), pertenece a la superfamilia RAMP.
Cas7	Subunidad del complejo CASCADE que une crRNA; no está presente en complejos de tipo III. En sistemas tipo III cumple función de escisión de crRNA. Es una proteína alargada rica en dominios RRM. Perteneciente a la superfamilia RAMP.
Cas8 (subunidad grande)	Subunidad del complejo CASCADE de clase 1, involucrada en el reconocimiento del PAM. Es multimodular, aunque diferentes familias de Cas8 no comparten homología de secuencia, presentan funciones equivalentes en los complejos efectores.
Cas9	Proteína efectora de los sistemas de tipo II, nucleasa programable de DNA. Contiene dominios RuvC y HNH que cortan cada hebra del DNA objetivo. Cas9 reconoce el PAM y genera crRNA y tracrRNA para dirigir el corte. También participa en la adaptación en algunos sistemas. Presenta varios subdominios, incluyendo dominios RuvC, HNH y un lóbulo C-terminal que reconoce PAM.
Cas10 (subunidad grande tipo III)	Subunidad grande de complejos de tipo III. Sintetiza oligoadenilatos cíclicos que actúan como moléculas señalizadoras. Posee dos dominios similares a Palm (polimerasas y ciclasas), un dominio con dedos de Zn y un dominio C-terminal tipo hélice α . Puede estar asociado a un dominio HD.
Cas11 (subunidad pequeña)	Proteína pequeña, principalmente α -helicoidal, subunidad de complejos CASCADE tipo I; interactúa con el crRNA. En muchos sistemas se fusiona con la subunidad grande Cas8. Existen variantes: Cse2 con dos dominios tipo haz de hélices; Csm2 y Cmsf poseen dominios similares a los encontrados en otros sistemas tipo I.

Cas12	Proteínas efectoras de tipo V, nucleasas programables de DNA. Cas12 contienen un dominio RuvC activo responsable del corte de ambas hebras de la secuencia diana. Cas12 puede poseer un subdominio adicional involucrado en procesamiento de pre-crRNA. Algunas variantes (tipo V-I) codifican una tracrRNA para procesar pre-crRNA junto con una RNasa bacteriana. Cas12 adopta forma bilobulada y contiene subdominios como HNH inactivo y dominios OB plegados para unir crRNA.
Cas13	Proteínas efectoras de tipo VI, nucleasas programables de RNA. Contienen dos dominios HEPN responsables del corte de RNA. Cas13a y Cas13d están involucradas en el procesamiento de pre-crRNA. Una vez activadas por el reconocimiento de RNA, actúan como nucleasas inespecíficas que cortan RNA cercano. Son proteínas multidominio con forma bilobulada.
Cas14	Proteína distintiva del tipo VII. Se une a un RNA objetivo y lo corta de manera secuencial de 5' a 3'. Presenta un dominio catalítico β -CASP dependiente de zinc.

Fuente: Adaptado de MAKAROVA; WOLF; KOONIN, 2022.

2.1.3 crRNA y tracrRNA

La característica interesante que otorga al sistema CRISPR-Cas su forma específica de combate a las infecciones de los EGM es la presencia de las nucleasas guiadas por RNA, las cuales son las encargadas de reconocer la secuencia objetivo mediante la unión complementaria de bases es el crRNA. Estos RNA son generados a partir del arreglo CRISPR y forman un complejo ribonucleoproteico junto con las proteínas Cas. Inicialmente la transcripción de la secuencia ocurre a partir del *leader* en el que se encuentra el promotor, generando una secuencia pre-crRNA. Esta molécula presenta generalmente estructuras secundarias en forma de bucles debido a que las repeticiones poseen secuencias internas de bases complementarias. Estos bucles permiten que las enzimas encargadas del procesamiento y generación de crRNA individuales funcionales

puedan unirse y escindir en sitios específicos. Además, en ciertos tipos de sistemas CRISPR-Cas, el procesamiento es auxiliado por otro RNA no codificante denominado tracrRNA (del inglés *trans-acting* crRNA, crRNA transactivante), el cual se une complementariamente a las repeticiones formando un región de RNA de doble cadena, el cual posteriormente es procesado por otras nucleasas. Una vez que el pre-crRNA es seccionado, la unión con las proteínas Cas es mediada por dominios de unión a RNA, que interactúan con las estructuras en bucle contenidas en las repeticiones, y en ciertos casos, el tracrRNA auxilia en la estabilidad del complejo (KARVELIS; SIKSNYS, 2022).

2.2 MECANISMO DE DEFENSA ENDÓGENO

2.2.1 Adaptación (*integración de espaciadores*).

La adaptación es el proceso de adquisición de nuevos espaciadores dentro del arreglo CRISPR, en la cual están involucradas las proteínas Cas1 y Cas2 en la gran mayoría de los sistemas, por lo que estas proteínas son las más conservadas en relación a todas las otras proteínas Cas. La nueva adición a partir de los protoespaciadores puede ocurrir por adquisición *de novo* (en inglés *naïve acquisition*) o primada (del inglés *primed acquisition*). El primer tipo de mecanismo de adaptación es aquel que permite la incorporación de secuencias de DNA que nunca entraron en contacto anteriormente con el organismo. Este tipo de adquisición está mediada principalmente por factores externos al sistema CRISPR, como lo es la recombinasa RecBCD, la cual permite la generación de secuencias dsDNA lineales que posteriormente son capturadas por el complejo de adaptación Cas1-Cas2 y se insertan en el arreglo CRISPR. Es importante mencionar que la generación de dsDNA lineal dentro de la célula ocurre en lugares donde existe una constante reparación del DNA, la cual puede ser provocada por la presencia de partículas infecciosas. De este modo, son adquiridas secuencias que pueden resultar de situaciones problemáticas para el metabolismo celular, impidiendo que puedan causar daño. Además, es importante resaltar que el genoma bacteriano está compuesto por cadenas de DNA circulares (DNA genómico y plasmídico), lo que en principio impediría la inserción de estas en el arreglo CRISPR y genere algún tipo de autoinmunidad. El segundo tipo de mecanismo de adaptación consiste en la inserción de secuencias dsDNA lineales generadas a partir de las nucleasas CRISPR, requiriendo la presencia del crRNA complementario a la secuencia objetivo (BARRANGOU; MARRAFFINI; SONTHEIMER, 2022).

2.2.2 Expresión y maduración del pre-crRNA (biogénesis del crRNA).

La producción de los crRNA que permitan dirigir la actividad nucleasa ocurre a partir de la transcripción del arreglo CRISPR, generando una molécula precursora denominada pre-crRNA, la cual es procesada mediante el corte en las regiones repetitivas, generando crRNAs, los cuales contienen la secuencia espaciador y regiones parciales de las regiones repetitivas. El procesamiento puede ocurrir por RNAsas bacterianas, por un complejo multiproteico conformado por otros tipos de Cas o por una proteína Cas de cadena única multidominio, en donde puede encontrarse involucrados otros RNA no codificantes con función estructural y auxilio al procesamiento (BHATIA; SHUKLA; YADAV, 2023).

2.2.3 Interferencia (corte de DNA o RNA invasor).

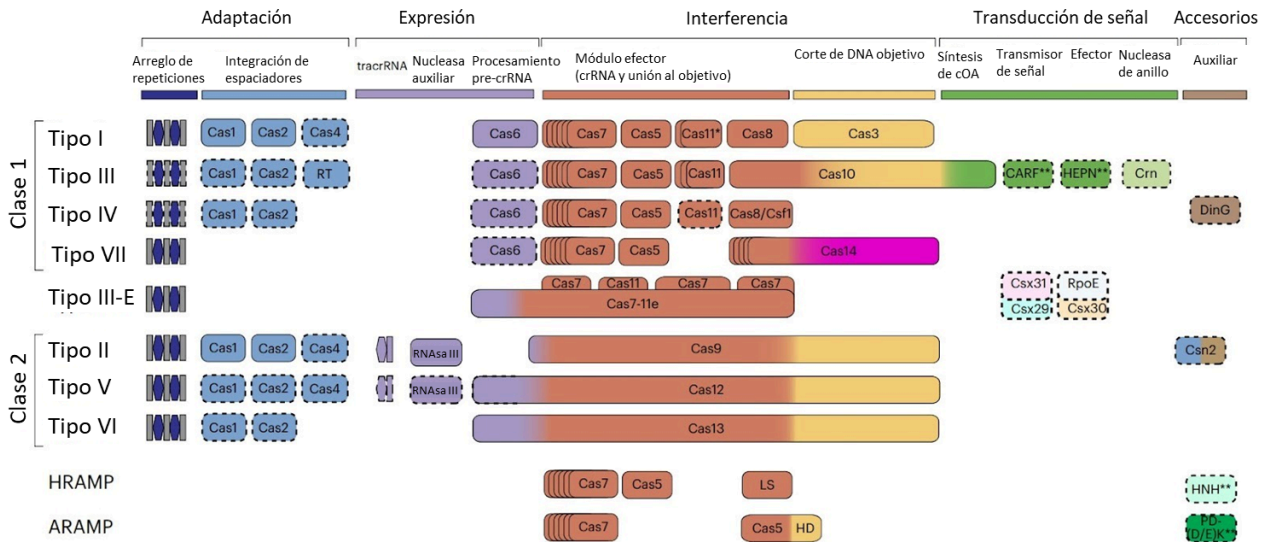
Una vez producido el crRNA funcional, este debe unirse a la nucleasa efectora encargada del clivado de las secuencias objetivo. Esta unión puede mediada por múltiples subunidades pertenecientes a un complejo proteico o dominios de una proteína multidominio, siendo en algunos casos también requerida la presencia de otros RNA no codificantes utilizados de andamio. La interacción del crRNA con las proteínas Cas ocurre en la región repetitiva de este, lo que deja libre al extremo encargado de unirse a la secuencia complementaria objetivo, la cual puede ser DNA o RNA, de cadena simple o doble. El reconocimiento del objetivo generalmente tiene puntos de control que permiten la distinción de secuencias endógenas del huésped y exógenas. Una vez que el complejo ribonucleoproteico se encuentra activo, este busca regiones denominadas PAM (del inglés *protospacer adjacent motif*, motivo adyacente al protoespaciador), las cuales se encuentran en alguno de los flancos de la secuencia objetivo complementaria al crRNA. Según el tipo de sistema, esta región tiene una secuencia de bases característica, la cual puede variar entre 2 a 4 nucleótidos. Mediante la interacción de esta región con dominios o subunidades proteicas específicos, el complejo detecta la presencia de un posible invasor y procede a continuar con la fase de la interferencia. Si es reconocida una región PAM, el complejo ribonucleoproteico sigue una serie de arreglos conformacionales que permiten la separación local de las hebras (en el caso de dsDNA), y permite realizar

el segundo punto de control: el reconocimiento de la secuencia semilla. Esta secuencia se encuentra normalmente inmediatamente a continuación de PAM, y para que la interferencia sea finalizada se requiere de la complementariedad perfecta de dicha secuencia con el crRNA, teniendo entre 5 a 8 nucleótidos de longitud. Si dicha coincidencia ocurre, los nucleótidos restantes del crRNA son apareados con el resto de la secuencia objetivo, donde en dicha unión pueden ser tolerados errores de apareamiento. La confirmación de la asociación permite cambios conformacionales del complejo que permiten la exhibición del sitio catalítico y posterior corte de la hebra (o hebras). Los dominios catalíticos con actividad nucleasa de DNA característicos encontrados en las enzimas Cas son el HNH, HD y RuvC; mientras que el dominio de corte RNA característico encontrado es el HEPN (MAKAROVA; WOLF; KOONIN, 2022; PLAGENS et al., 2015).

2.3 CLASIFICACIÓN GENERAL DE LOS SISTEMAS CRISPR

Los sistemas CRISPR-Cas son clasificados según la relación evolutiva entre los loci CRISPR-cas existentes, además de la comparación de la composición de genes, estructura de los loci y la filogenia. Según la arquitectura de los módulos efectores involucrados en las etapas de procesamiento de crRNA e interferencia, los sistemas CRISPR pueden clasificarse en dos clases, siguiendo la clasificación realizada más reciente, la cual fue publicada en noviembre de 2025 (Imagen 2). La clase 1 presenta los módulos efectores compuestos por varias proteínas Cas y otras auxiliares, las cuales se encargan de la expresión, procesamiento e interferencia. La clase 2, por el contrario, presenta una única proteína con múltiples dominios que realizan todas las actividades de las etapas mencionadas. Luego de las clases, la siguiente jerarquía de clasificación son los tipos de sistemas, existiendo siete distintos según las proteínas Cas distintivas. Los tipos I, III, IV y VII pertenecen a la clase 1, y los tipos II, V y VI pertenecen a la clase 2. En relación a las proteínas Cas, no existen genes relacionados a ellas compartidos por todos los sistemas CRISPR-Cas, pero existen algunos que son más abundantes. Los tipos pueden subdividirse en subtipos que a su vez pueden tener variantes, generando así una clasificación dependiente de semejanzas funcionales, estructurales y filogenéticas. (MAKAROVA et al., 2020, 2025).

Imagen 2 – Clasificación de los sistemas CRISPR-Cas.



Fuente: Adaptado de MAKAROVA et al., 2025

Nota: En los sistemas CRISPR–Cas de clase 1, los módulos efectores están formados por múltiples proteínas Cas que se ensamblan en un complejo unido al crRNA para reconocer y cortar el blanco, mientras que en la clase 2 un único efector multidominio cumple todas estas funciones. El subtipo III-E es una excepción dentro de la clase 1, pues posee un único efector con dominios derivados de sistemas III-D. El esquema muestra la organización genética, estructural y funcional de los siete tipos de sistemas CRISPR–Cas, indicando con líneas discontinuas los componentes prescindibles o ausentes en algunos subtipos. Cas6 se representa como variable: esencial en la mayoría de los sistemas tipo I pero dispensable en algunos, y aportado en trans en la mayoría de los tipo III. El tipo VII incluye el efector exclusivo Cas14, compuesto por una RNasa β -CASP y un dominio homólogo al extremo C-terminal de Cas10. Los colores asignados a Cas9, Cas10, Cas12 y Cas13 reflejan que intervienen en distintas etapas de la actividad CRISPR–Cas. Los dominios CARF (sensor) y HEPN (efector RNasa), a menudo fusionados, son frecuentes en los módulos auxiliares del tipo III, junto con sensores y efectores alternativos. Fuente: MAKAROVA et al., 2025.

2.3.1 Clase 1: complejos multiproteicos (tipos I, III e IV).

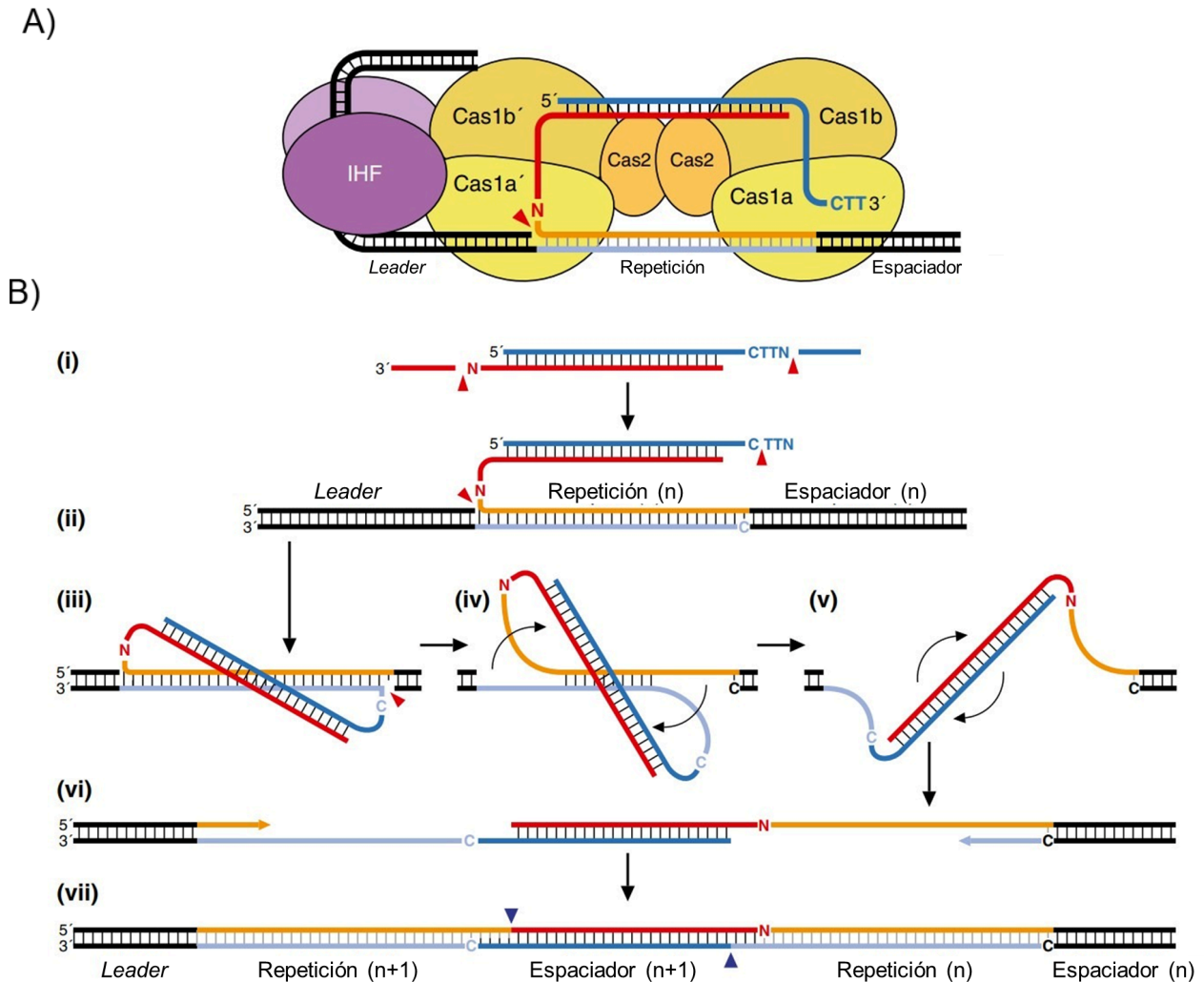
Los sistemas CRISPR-Cas de clase 1 actualmente están subclasificados en 4 tipos (I, III, IV y VII) y 21 subtipos. Todos estos sistemas comparten cierta organización de los complejos efectores y los andamios necesarios para generar su estructura funcional. La presencia de dominios de reconocimiento a RNA (RRM, del inglés RNA recognition motif) presentes en subunidades grandes y pequeñas del complejo permite una arquitectura uniforme de manera general, con diferencias en la posición y cantidad de estos dominios (MAKAROVA; WOLF; KOONIN, 2022; MAKAROVA et al., 2025).

2.3.1.1 Tipo I

Los sistemas de tipo I son los más abundantes en el mundo microbiano, siendo la proteína Cas distintiva la Cas3, que generalmente presenta función helicasa y nucleasa, pero pueden codificarse en genes diferentes en algunos subtipos y variantes. Presenta 7 subtipos (desde el I-A a I-G), en los cuales se presentan 8 genes cas (Cas1 al Cas8), pudiendo estar codificados por un solo operón o varios. En el subtipo I-A y I-B, la función de Cas3 se encuentra distribuida en dos diferentes subunidades (nucleasa y helicasa), así como la Cas8, que presenta subunidades separadas. En el subtipo I-C la Cas6 fue perdida y su función fue reemplazada por Cas5. En el subtipo I-D, la función nucleasa de Cas3 se traslada a la Cas10d, que no muestra otras funciones presentes en el tipo III como la polimerasa y ciclasa. En subtipo I-E se observa la presencia de la subunidad grande Cas8e y la subunidad pequeña Cse2. El subtipo I-F presenta la fusión de Cas2 y Cas3. El subtipo I-G presenta dos fusiones únicas: Cas1 y Cas4, y Cas5 con Cas6 (MAKAROVA; WOLF; KOONIN, 2013).

El mecanismo de adaptación general relativo al tipo I es mediado por un complejo que presenta una proporción de 4:2 de las proteínas Cas1 y Cas2 respectivamente (Imagen 3). Estas pueden seleccionar secuencias de dsDNA o ssDNA con una doble hebra parcial en las cuales se detecta las secuencias PAM (por ejemplo 5' CTT en *E. coli*), que luego son procesadas por nucleasas del huésped (como DNA pol III y ExoT) o del sistema CRISPR (como Cas4) que generan extremos cohesivos con extensiones 3'. El fragmento es llevado por el complejo hasta la región *leader* del arreglo CRISPR, y con la ayuda de factores endógenos como IHF (*integration host factor*, factor de integración del hospedador) se media la desestabilización de las hebras de la primera repetición al lado del *leader* y se produce el ataque del extremo 3' del pre-espaciador a la región entre el *leader* y la primera repetición. Luego como paso final la secuencia PAM es retirada (dejando una C terminal) y el extremo restante también produce un ataque nucleofílico con su extremo 3'. Posteriormente ocurre la desnaturalización de la repetición que permite la completa inserción del nuevo espaciador. Finalmente ocurre la síntesis de cadenas complementarias y ligación por polimerasas y ligasas del huésped (RICHTER et al., 2014; VAN DER OOST, 2022).

Imagen 3 – Mecanismo de adaptación observado en los sistemas CRISPR de tipo I.



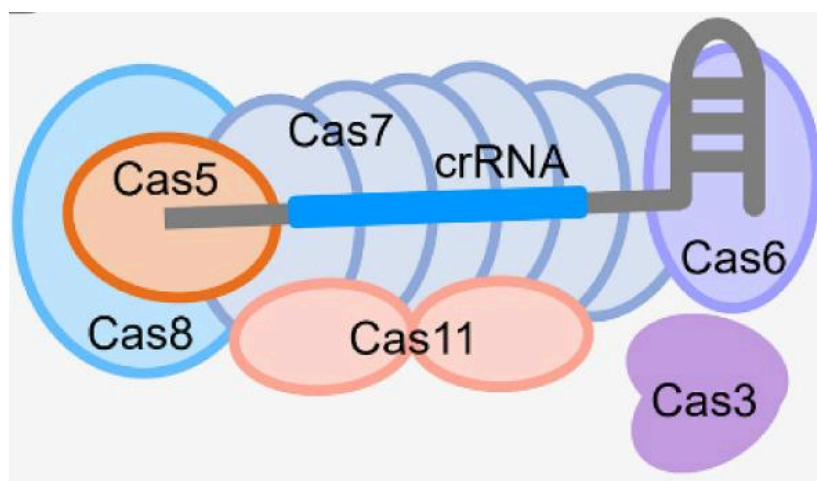
Fuente: Adaptado de VAN DER OOST, 2022.

Nota: A) Esquema del primer ataque nucleofílico en el sitio *leader*, realizado por la extensión 3' no-PAM del *pre-espaciador* cargado en el complejo Cas1–Cas2. En *E. coli*, la desestabilización del repeat adyacente al líder, promovida por la unión del factor de integración IHF al líder, favorece la inserción de nuevos *espaciadores* en el extremo *leader*-proximal del arreglo CRISPR. B) Mecanismo paso a paso de la integración de *espaciadores* mediada por Cas1–Cas2: (i) el complejo Cas1–Cas2 une fragmentos de DNA de doble hebra que contienen PAM, tras lo cual exonucleasas no-Cas recortan las extensiones 3' generando un *pre-espaciador* asimétrico; (ii) la extensión 3' sin PAM ataca el sitio *leader* mientras se recorta la extensión 3' que contiene PAM; (iii) la extensión 3' derivada del PAM ataca el sitio secundario; (iv–v) la repetición se desestabiliza y se desnaturaliza; (vi) una DNA polimerasa no-Cas sintetiza la segunda hebra; y (vii) una ligasa no-Cas sella los huecos mediante enlaces covalentes. Fuente: VAN DER OOST, 2022.

El complejo efector de la clase 1 se lo denomina como complejo CASCADE-crRNA (CRISPR-associated complex for antiviral defense, Complejo Asociado

a CRISPR para la Defensa Antiviral), y su primera caracterización se dio en el estudio del subtipo I-E en *E. Coli* (Imagen 4). Se observó que 11 subunidades proteicas eran necesarias para el procesamiento y capacidad de corte específico pertenecientes a las clases: Cas5, Cas6, Cas7, Cas8 y Cas11. El procesamiento del crRNA es realizado por la subunidad Cas6. El proceso de reconocimiento del DNA objetivo inicia cuando la región PAM de este se une a Cas8, lo que permite la separación de la doble hebra de manera local. En ese estado, el inicio de la complementariedad de bases entre crRNA y el DNA objetivo ocurre en una región denominada “semilla”, que determina la continuación del proceso de interferencia. Si en esta secuencia ocurren errores de apareamiento, el proceso se detiene. Si ocurre un apareamiento perfecto, la hebra se separa aún más, permitiendo la unión de toda la extensión del crRNA al DNA objetivo, en la cual se pueden tolerar ciertos errores. De esta forma se construye un bucle R, el cual es característico del proceso de interferencia de la mayoría de los sistemas CRISPR. Luego de estas etapas, si la unión fue exitosa, se recluta a la Cas3 para realizar el corte de la secuencia no objetivo, la cual es enrollada hacia el dominio nucleasa generando más de un corte en la misma hebra y liberando el fragmento. La hebra no cortada genera un bucle que es expuesto a otras nucleasas, permitiendo que ocurra un daño severo en el DNA y se impida la infección por el EGM (COOPER; STRINGER; WADE, 2018; VAN DER OOST, 2022).

Imagen 4 – Complejo de interferencia observado en los sistemas CRISPR de tipo I.



Fuente: XU et al., 2023.

Nota: Disposición de las subunidades en el complejo CASCADE-crRNA. Cas5 se une al extremo 5' del crRNA. Cas7 forma el esqueleto del complejo, pudiendo tener actividad nucleasa. Cas 6 procesa el pre-crRNA en la etapa de la biogénesis, siendo reclutada en paso posterior a la formación del complejo. Cas

11 permite la estabilización del complejo con el crRNA, así como Cas8.

Entre las aplicaciones documentadas de este sistema CRISPR se encuentran algunas como la edición genética y la regulación transcripcional. La edición genética puede generarse mediante la delección de fragmentos cromosómicos o plasmidiales por autoreconocimiento de los sistemas CRISPR, los cuales pueden ser introducidos de forma sintética. Estas delecciones pueden utilizarse como métodos de contraselección, donde las bacterias que sean transformadas con los genes CRISPR-Cas dirigidos a secuencias cromosómicas resultan en muerte celular. Este sistema puede ser acoplado a la adición de genes exógenos, que puede lograrse mediante la inserción de moldes de DNA junto con los componentes del sistema CRISPR. De este modo las nucleasas Cas generan cortes dobles en la doble hélice en lugares donde se requiere la inserción de un gen, que al generar daño en el cromosoma los sistemas de reparación utilizan estrategias de recombinación homóloga (HDR) que requieren de los moldes de DNA con extremos que presentan homología a la región a ser reparada (Ver Imagen 18). Si la región cromosómica no ha sido recombinada exitosamente, las nucleasas Cas atacarían esa región no modificada generando toxicidad y eliminando a las bacterias no recombinantes. Sin embargo, el uso de los sistemas de edición genética programada fueron reemplazados casi en su totalidad por las nucleasas Cas del tipo II, que son más precisas, desplazando a los sistemas de tipo I en este tipo de aplicaciones. La nucleasa Cas3 encargada de realizar el corte en la región objetivo presenta un carácter destructivo que no permite su uso para cortes de precisión, por lo que fueron probadas otras estrategias de edición utilizando otras nucleasas fusionadas al complejo CASCADE junto con señales nucleares, lo que resultó en eficiencias por encima del 50% (VAN DER OOST, 2022; BROUNS; VAN DER OOST, 2023).

Además, con la inactivación de la nucleasa Cas3, los sistemas de tipo I pueden utilizarse para generar reducción de la actividad transcripcional, bloqueando la actividad de la RNA polimerasa en promotores inactivados por la presencia de complejos CRISPR-Cas en ellos, pudiéndose regular la expresión génica de varios genes a la vez. Además, pueden generarse complejos fusionados a activadores de la transcripción que pueden modular positivamente la expresión de promotores específicos. De este modo se puede estudiar la función de genes en rutas metabólicas de interés (JIANG et al., 2013; SHEN et al., 2013).

2.3.1.2 Tipo III

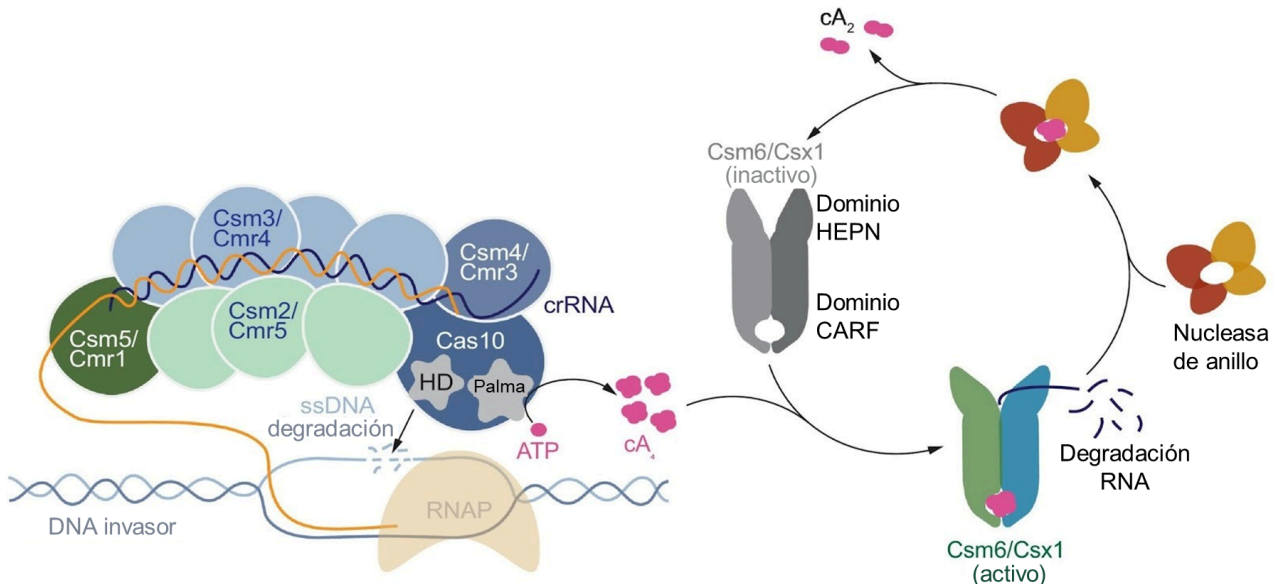
El sistema CRISPR-Cas de tipo III es el segundo más abundante en relación a todas las especies de bacterias y arqueas completamente secuenciadas. La gran diversidad de estructuras, componentes y funciones de los sistemas encontrados, sin embargo, presentan al tipo III como el más complejo de todos. Este tipo presenta 9 subtipos (III-A a III-I), en los cuales la proteína Cas distintiva es las Cas10. En estos sistemas la característica más distintiva en relación a los sistemas de tipo I es el reconocimiento de secuencias objetivo de RNA, donde las enzimas de corte pueden tener una doble función nucleasa, escindiendo el DNA y RNA. Este hecho conlleva a variaciones en las etapas de adaptación e interferencia (DENG et al., 2013; MAKAROVA et al., 2025).

La adquisición de nuevos espaciadores fue descrita en sistemas de tipo III-B de la especie *Marinomonas mediterranea*. En ellos se observa la presencia de una proteína Cas2 y una Cas1, la cual presenta un dominio con actividad retrotranscriptasa, permitiendo la inserción de fragmentos de dsDNA y ssRNA al arreglo CRISPR. En relación a la inserción de fragmentos de cDNA generados a partir de RNA, existen incertezas en relación a la generación de crRNA funcionales a partir de estos, debido a que la orientación de inserción del cDNA podría generar crRNAs que sean exactamente iguales a las secuencias objetivo (no complementarias), dando a la respuesta inmune un 50% de efectividad (ZHANG et al., 2022).

Para la formación del complejo efector funcional se requiere que el arreglo CRISPR sea transcrito, generando un pre-crRNA que es procesado por Cas6 en los bucles creados en las secuencias repetitivas (Imagen 5). El corte ocurre hacia el extremo 3' de bucle, lo que produce la formación de un crRNA intermediario que presenta un *tag* en el extremo 5' (perteneciente a la repetición corriente arriba), el espaciador y el bucle (perteneciente a la repetición corriente abajo). Este fragmento es transferido desde la Cas6 al complejo efector formado por la proteína Cas10 y subunidades auxiliares como Csm2 (conocida también como Cmr5) o Csm5 (conocida también como Cmr6) en los tipos III-A y III-B respectivamente. Luego de la unión al complejo, el crRNA intermedio es clivado en su extremo 3', lo que elimina el bucle y una región 3' terminal del espaciador. Esta función es realizada por una nucleasa endógena polinucleótido fosforilasa (PNPase), la cual es reclutada por Csm5. Las subunidades que forman el esqueleto estructural del complejo (denominadas Csm3 o Cmr4) se encargan de proteger el extremo 5' del crRNA

intermediario y funcionan como una regla molecular definiendo la longitud de los cortes. El tag del crRNA se une a las subunidades Cas10 y Csm4, mientras el espaciador se liga Csm3 (también conocida como Cmr4) y Csm2 (ICHIKAWA et al., 2017).

Imagen 5 – Mecanismo de interferencia encontrado en el sistema CRISPR de tipo III.



Fuente: Adaptado de STELLA; MARRAFFINI, 2024.

Nota: Cuando el DNA blanco es transcrito por la RNA polimerasa, el crRNA del complejo Cas10–Csm/Cmr reconoce el RNA invasor complementario. Esta unión activa tres procesos: (1) el dominio HD de Cas10 degrada ssDNA, probablemente generado en la burbuja de transcripción; (2) el dominio “palm” de Cas10 sintetiza oligoadenilato cíclico (cOA) a partir de ATP, el cual activa la RNasa inespecífica Csm6/Csx1; y (3) la subunidad Csm3/Cmr4 corta el RNA diana, rompiendo el apareamiento con el crRNA y desactivando ambos dominios de Cas10. También se observa a la derecha de la imagen como ocurre la activación de las nucleasas no específicas mediante los cOA (cA en la imagen) degradan RNA.

Posteriormente, el complejo efector queda funcionalmente activo para reconocer secuencias objetivo complementarias al crRNA. Fue observado que estas secuencias son de RNA, pertenecientes a los transcritos de los agentes invasores. Es probable que el complejo efector se asocie a estos transcritos de manera inmediata tras su síntesis por la RNA polimerasa. El crRNA interactúa por su extremo 3' con la secuencia objetivo inicialmente, lo que causa un cambio conformacional en Cas10 que permite ampliar un canal interno por donde pasa el heteroduplex crRNA-RNA objetivo. Esto permite que se volteen bases del espaciador en intervalos de 6 bases, permitiendo la estabilización del heteroduplex dentro del complejo (MARRAFFINI, 2022).

La reorganización de Cas10 permite la activación de 2 dominios internos. El

primero de ellos es el dominio HD que degrada ssDNA de forma no específica, produciendo el corte de la hebra no transcrita. Esto sugiere que la destrucción eficiente de DNA invasores solo ocurre cuando la tasa de transcripción de estos es alta, como es la situación de fagos de ciclo lítico y genes de expresión temprana. En cambio se genera una mayor tolerancia a fagos lisogénicos que no presentan una fuerte expresión de sus genes. El segundo dominio activado es aquel con función polimerasa/ciclasa, que convierte el ATP en oligoadenilados cíclicos (cOA) de 2 a 6 unidades de adenosina. Estas moléculas sirven como segundos mensajeros, los cuales activan proteínas accesorias que presentan un dominio de unión a ellos, como el dominio CARF (de *CRISPR-associated Rossmann fold*, pliegue Rossmann asociado a CRISPR). Este es el caso de las proteínas Csm6 y Csx1 que al unirse a cOA activan un dominio RNasa denominado HEPN (*higher eukaryotes and prokaryotes nuclease*; dominio de unión a nucleótidos de eucariotas superiores y procariotas). La actividad catalítica de este dominio permite la degradación de RNA de forma no específica, permitiendo la degradación de los transcritos invasores, cuando la degradación de DNA no es eficiente. Sin embargo, los RNA del huésped también son degradados, lo que causa la detención temporal del crecimiento celular, permitiendo la depuración total del DNA invasor antes que puedan producir partículas virales, además de prevenir el escape de fagos con mutaciones en la secuencia objetivo (MARRAFFINI, 2022).

La activación de Csm6 (o Csx1) puede generar toxicidad celular, por lo que existen algunas formas de evitar su actividad prolongada. Una de ellas es la degradación del heterodúplex crRNA-RNA objetivo por Csm3 en los intervalos de bases volteadas. Esta degradación permite que la generación de segundos mensajeros se detenga. Sin embargo, las Csm6 ya activas no se detienen por este mecanismo, sino por la escisión del cOA de la proteína. Esto ocurre mediante un mecanismo interno de Csm6, lo que indicaría que la actividad RNasa no ocurre por mucho tiempo. También fueron observados otros mecanismos de escisión externos a Csm6, que requieren de mayor caracterización (MARRAFFINI, 2022).

Un problema de la activación de corte de RNA colateral es que la producción de transcritos del arreglo CRISPR en sentido opuesto generaría complementariedad con las moléculas de crRNA, lo que activaría al sistema de tipo III innecesariamente. Este tipo de transcripción ocurre esporádicamente, pero podría generar problemas relacionados a la degradación de RNAs endógenos como mecanismos de muerte abortiva. Estas situaciones son superadas debido a que la complementariedad de las secuencias

objetivos con el *tag* del crRNA impide la activación de los dominios catalíticos de Cas10. Este mecanismo también permite evitar la autoinmunidad por reconocimiento de secuencias endógenas, lo que en otros sistemas es realizado por la región PAM en la secuencia objetivo. Se observó que variaciones de las regiones flanqueantes a la región de complementariedad con el crRNA no disminuyen la inmunidad generada por algunos sistemas CRISPR de tipo III. Otros estudios muestran que en ciertas especies sí podría existir una región PAM de RNA que deba ser primeramente reconocida antes de activar las funciones del complejo efector (ESTRELLA; KUO; BAILEY, 2016).

Esta coexistencia de mecanismos de autorreconocimiento podría ser explicada debido a que varios sistemas de tipo III se relacionan a sistemas de tipo I, por una posible coevolución que generó el uso cruzado de componentes entre sistemas. Esta diversidad de sistemas de tipo III también muestra la existencia de Cas10 sin dominio CARF (permitiendo solo la habilidad DNAsa del dominio HD) en los subtipos III-D, y por el contrario, Cas10 sin el dominio HD (solo con actividad RNasa colateral) en los subtipos III-C. Otro subtipo resaltante es el III-E, que no presenta Cas10 ni dominio CARF-HEPN, en el que además las subunidades Cas7 y Cas11 se encuentran fusionadas en una única proteína multidominio, y se observa la presencia de proteínas auxiliares Csx29 (una proteasa similar a caspasa). Este subtipo por lo tanto no presenta actividad DNAsa ni RNasa colateral, y solo se conserva el sitio de procesamiento del pre-crRNA presente en Cas7. Este hecho podría hacer suponer que el subtipo III-E no pertenece a la clase 1 de sistemas CRISPR, sin embargo está clara la evolución de este tipo de sistema a partir del tipo III típico. Una mejor caracterización de estos sistemas permite el entendimiento más profundo de la función y diversidad de los sistemas CRISPR-Cas (KAZLAUSKIENE et al., 2017).

Entre las aplicaciones biotecnológicas posibles de los sistemas CRISPR tipo III se encuentra defensa antiviral, que representa un problema en la industria de producción asociada a microorganismos. Los sistemas de tipo III son dos veces más robustos frente a los sistemas de tipo II por ejemplo, debido a que para escapar de la inmunidad los fagos requieren de condiciones que podrían afectar su viabilidad productiva, como lo es la acumulación de múltiples mutaciones en regiones de protoespaciadores, que pueden estar vinculadas a genes esenciales. Por tanto, la utilización de componentes importantes para la ingeniería de resistencia a fagos y la biología sintética permite activar respuestas celulares amplias, incluida la activación de efectores auxiliares (por ejemplo proteínas CARF), que amplía su utilidad para la inmunidad a nivel poblacional y, potencialmente,

para el control programable del destino celular (CHOU-ZHENG; HATOUM-ASLAN, 2019). Otra aplicación de los sistemas de tipo III es en el uso para diagnóstico y detección de ácidos nucleicos. Las actividades de escisión doble de RNA y DNA, junto con su amplificación de señal intrínseca, permiten la detección rápida de patógenos como SARS-CoV-2 con sensibilidades clínicamente relevantes, incluso sin amplificación del objetivo. Plataformas diagnósticas como SCOPE aprovechan estas propiedades para lograr una detección flexible y rigurosa (SANTIAGO-FRANGOS et al, 2021; STEENS et al, 2021).

2.3.1.3 Tipo IV

Los sistemas CRISPR tipo IV presentan una gran variabilidad de composición genética, sugiriendo una fragmentación evolutiva de sistema de tipo III. La proteína distintiva es denominada Csf1, la cual presenta un pequeño tamaño y realiza la función de la subunidad grande del complejo efector, cumpliendo funciones clave de reconocimiento, unión al objetivo. Existen actualmente 3 subtipos (IV-A a IV-C) según la organización del operón cas. En los subtipos IV-A y IV-B la organización Cas5-Cas7-Csf1 es la encontrada. En el subtipo IV-C la proteína Csf1 presenta poca similaridad con los anteriores subtipos, la cual posee una actividad nucleasa por la presencia de un dominio HD derivado de Cas10, presentándose como un sistema intermedio entre los sistemas de tipo III y tipo IV. Otra característica del tipo IV es la presencia de proteínas accesorias exclusivas como la helicasa DinG (IV-A), la reductasa inactivada APS/PAPS CysH (en IV-B) y helicasa del sistema RecD (IV-D) (MOYA-BELTRÁN et al., 2021; MAKAROVA; WOLF; KOONIN, 2022).

En relación al mecanismo de adaptación, resalta la ausencia de genes mediadores de la adquisición de nuevos espaciadores, lo que sugiere que este proceso está dirigido por complejos adaptativos de otros sistemas CRISPR que coexisten en el huésped (como por ejemplo el tipo I). Esta evidencia es apoyada por la gran similaridad de los arreglos CRISPR de tipo IV con arreglos de otros sistemas, en especial con el tipo I-E. Otro factor es la presencia de regiones PAM en los protoespaciadores de los que derivan los espaciadores pertenecientes a los arreglos CRISPR de tipo IV, los cuales presentan la secuencia PAM característica de los sistemas de tipo I (-AAG-) (PINILLA-REDONDO et al., 2020).

La presencia de nucleasas semejantes a Cas6 aparentemente exclusivas del tipo IV muestran que la construcción de complejos funcionales depende del

procesamiento del pre-crRNA por enzimas del conjunto de genes del arreglo CRISPR de los sistemas de tipo IV (ÖZCAN et al., 2019).

La gran diferencia de este sistema CRISPR es que, a excepción del tipo IV-C, no existe una nucleasa reconocida con función catalítica, por lo que la función del mecanismo de interferencia parece restringirse a bloqueos de replicación de transcripción o replicación. Esta idea es reforzada observándose que este tipo de sistemas solo se encuentran en fagos, plásmidos y elementos conjugativos, representando un papel en la competición entre EGM. Además, la comparación de los espaciadores dentro de los arreglos CRISPR de tipo IV demuestra que casi la mayoría provienen de regiones relacionadas a la maquinaria conjugativa de plásmidos. Por lo tanto el mecanismo de interferencia no involucraría directamente el corte de secuencias, si no que se valería de otras estrategias con ayuda de proteínas no pertenecientes al sistema CRISPR. Entre las estrategias de interferencia se pueden encontrar la desestabilización de las horquillas de replicación, la separación de las hebras facilitando el acceso a enzimas de restricción, modificación epigenética para el silenciamiento génico y bloqueo de la RNA polimerasa y factores de transcripción. En conjunto, estos mecanismos generan ventajas moleculares en la lucha por recursos celulares contra otros EGM (PINILLA-REDONDO et al., 2020).

2.3.2 Clase 2: proteína única multifuncional (tipos II, V e VI)

La segunda clase referente a la clasificación de los sistemas CRISPR-Cas es caracterizada por la presencia de una única proteína grande multidominio efectora. Los sistemas CRISPR de clase 2 son relativamente infrecuentes en los procariontes, ya que solo alrededor del 10% de los genomas bacterianos analizados los contienen, y su aparición en arqueas es muy rara. El descubrimiento de esta clase permitió el desarrollo de herramientas que involucran edición genética, que son altamente eficientes y selectivas (MAKAROVA; WOLF; KOONIN, 2022).

2.3.2.1 Tipo II

Uno de los sistemas CRISPR que impulsó el desarrollo de técnicas innovadoras de edición genética es el tipo II, en el cual participa la proteína distintiva Cas9, implicada en las tres etapas de la respuesta defensiva mediada por CRISPR. El descubrimiento de esta herramienta permitió un avance significativo en los experimentos de edición genética en

comparación con las tecnologías de manipulación genética utilizadas previamente (ZHU, 2022).

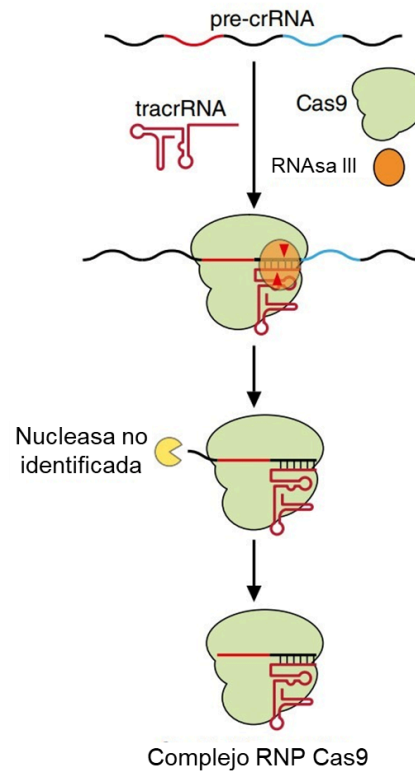
Los sistemas de tipo II son clasificados en 4 diferentes subtipos (II-A a II-D), siendo agrupados según la composición de los genes *cas* presentes. En el subtipo II-A se presentan los genes *cas9*, *cas1*, *cas2* y *csn2*. En el subtipo II-B se encuentran los mismos genes, donde *csn2* es reemplazado por *cas4*. En el subtipo II-C no se observan homólogos a *cas4* o *csn2*. El subtipo II-D fue recientemente descubierto, y está caracterizado por presentar una Cas9 menor y un conjunto de genes *cas* no asociados a ningún otro conocido (MAKAROVA et al., 2025).

El proceso de adaptación de los sistemas de tipo II es similar al mecanismo encontrado en los sistemas de tipo I, donde la presencia de Cas1 y Cas2 es fundamental para la inserción de nuevos espaciadores en el arreglo CRISPR. Sin embargo existen otras proteínas que también participan de este proceso. En el subtipo II-A, todas las proteínas presentes en el locus *cas* (*cas1*, *cas2*, *csn2* y *ca9*) intervienen en la adaptación, donde las proteínas Cas9 y Csn2 presentan actividades relacionadas a la captación de las secuencias nucleotídicas. Se intuye que Cas9 está involucrada en el reconocimiento de la secuencia PAM, que permite la distinción de secuencias invasoras de secuencias endógenas. En el subtipo II-B Csn2 es sustituida por Cas4, que en el tipo I permite la digestión de extremos pertenecientes a la doble hebra que posee la secuencia del protoespaciadores. Se desconoce si Cas4 realiza la misma función en el subtipo II-B. En el subtipo II-C no están presentes Cas4 ni Csn2, lo que indicaría que Cas9 y el complejo Cas1-Cas2 realizan el trabajo, o son utilizados factores del huésped auxiliares (KA et al., 2018; KARVELIS; SIKSNYS, 2022).

La etapa de biogénesis del crRNA requiere la transcripción del arreglo CRISPR, lo que genera el pre-crRNA que debe pasar por un proceso de maduración (Imagen 6). Esta maduración es realizada por la RNAsa endógena RNAsa III y otras nucleasas todavía no conocidas. Además se requiere la presencia de un RNA no codificante transactivador (tracrRNA), el cual es complementario a las repeticiones. Esta unión genera un dúplex que permite el procesamiento por la RNAsa III, aunque la ausencia de esta enzima no impide la finalización exitosa de la maduración. Fue observado que en la especie *Streptococcus pyogenes* se genera un crRNA maduro de 42 nucleótidos (donde el espaciador presenta 20 nucleótidos en el extremo 5' y la repetición 22 nucleótidos en el extremo 3') y una molécula residual de RNA. El subtipo II-C se observó que la expresión inicia en promotores internos dentro de las repeticiones, lo que genera crRNAs que no

necesitan ser procesados en el extremo 5' (CHARPENTIER et al., 2015; KARVELIS; SIKSNYS, 2022).

Imagen 6 – Procesamiento del pre-crRNA en los sistemas CRISPR de tipo II.

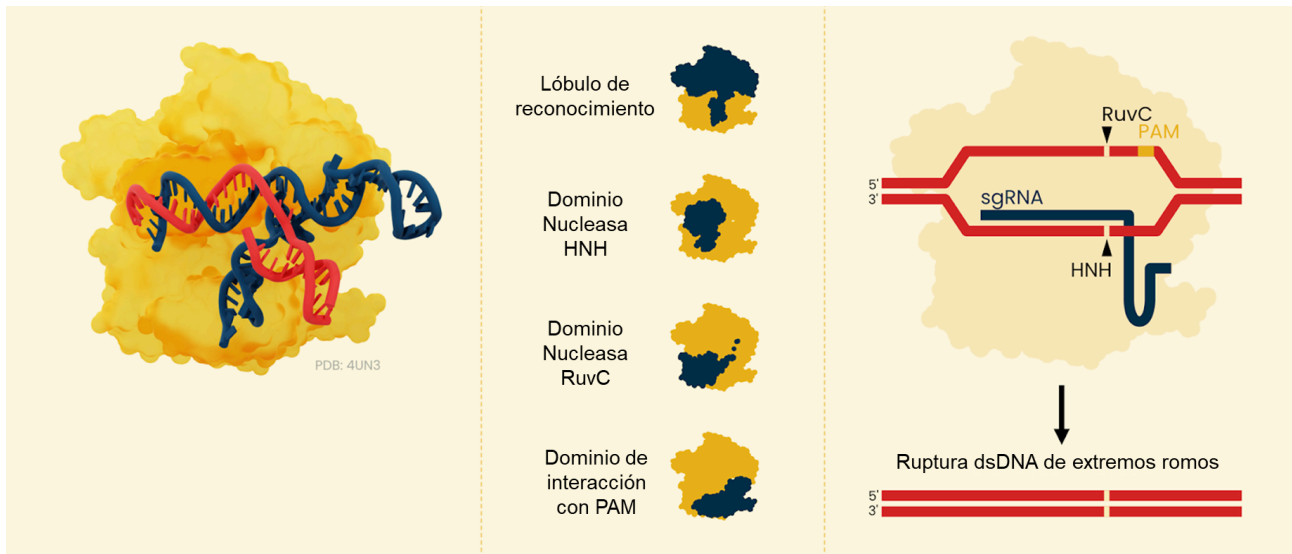


Fuente: Adaptado de KARVELIS; SIKSNYS, 2022.

Nota: Biogénesis del crRNA en sistemas de tipo II: el tracrRNA codificado en *trans* se aparea con la región de repetición del pre-crRNA en presencia de Cas9, formando un dúplex de RNA que es reconocido y escindido por la RNasa III endógena. Un procesamiento adicional, mediado por una nucleasa aún no identificada, genera el extremo 5' y produce el crRNA maduro de aproximadamente 42 nucleótidos.

La interferencia ocurre luego de la formación del complejo ribonucleoproteico de Cas9 con el duplex parcial crRNA-tracrRNA, siendo la molécula objetivo dsDNA. El reconocimiento del objetivo ocurre mediante la interacción con la región PAM presente en su secuencia. Luego de este reconocimiento inicia la formación de un bucle R que permite la ligación del crRNA a la secuencia objetivo por complementariedad de bases, que una vez confirmada permite la escisión de cada una de las hebras del DNA objetivo. Este corte es mediado por la proteína Cas9 que cliva las dos hebras del dsDNA objetivo en el mismo sitio, produciendo extremos romos (HILLARY; CEASAR, 2023).

Imagen 7 – Estructura del complejo efector de los sistemas CRISPR de tipo II y mecanismo de corte.



Fuente: Adaptado de DETURK, 2025.

Nota: Forma bilobular del complejo Cas9-crRNA, con la presencia de los dominios catalíticos (RuvC y HNH) y de interacción con el heteroduplex crRNA-DNA objetivo (de interacción a PAM). A la derecha se observa el corte realizado por el complejo.

Debido a la importancia actual que presenta la proteína Cas9 en aplicaciones de edición genética, la estructura proteica y el mecanismo por el cual es generado el corte en las hebras están bastante estudiados (Imagen 7). La Cas9 es una proteína que presenta dos lóbulos, uno involucrado en el reconocimiento del objetivo (REC) y otro con actividad nucleasa (NUC). En el medio de estas estructuras se encuentra un espacio cargado positivamente que permite el ingreso de la secuencia objetivo, el cual se estructura luego de un cambio conformacional causado por la unión del dúplex crRNA-tracrRNA. En el lóbulo NUC se encuentran las dos regiones con actividad nucleasa (HNH y RuvC) y el dominio de unión a PAM (PI), el cual es expuesto cuando el complejo ribonucleoproteico es formado. La detección de una región PAM en el extremo 3' del objetivo genera arreglos estructurales que permiten la formación de un bucle R, donde se requiere una complementariedad de bases del crRNA con el objetivo en una región semilla de 10 a 12 nucleótidos (ya mencionada anteriormente para otros sistemas), que una vez confirmada permite la extensión de la unión hacia el extremo distal a PAM. La formación del bucle permite que las hebras se posicionen en los dominios catalíticos, situándose en HNH la hebra complementaria al crRNA y la no complementaria en RuvC. Una vez posicionadas

las hebras se produce el doble corte, lo que reestructura al lóbulo REC. Este hecho genera múltiples interacciones de la Cas9 con el DNA clivado, lo que causa su inactivación catalítica (SHMAKOV et al., 2015).

Debido a la actividad relativamente simple, eficiente y específica de Cas9 para generar un corte en dos hebras (DSB), la enzima recibió mucha atención en los últimos años debido a las aplicaciones biotecnológicas que se pueden obtener. La más difundida es la utilización para la edición genética, que implica a la maquinaria de reparación de DNA endógeno de la célula que está siendo modificada. Cuando ocurre un corte de doble cadena en el DNA genómico de una célula (generado por Cas9) se activan dos mecanismos de reparación para evitar la muerte celular: la unión de extremos no homólogos (NHEJ) y la recombinación homóloga (HDR) (Ver Imagen 18). El mecanismo deseable en la edición génica es el segundo, en el que es otorgada una secuencia molde con extremos homólogos para reparar un corte de doble cadena. De este modo, introduciendo una plantilla con una secuencia de interés se puede modificar el DNA genómico, causando un *knock-in* génico (ZHU, 2022). Sin embargo, el mecanismo de NHEJ (en el cual DSBs son reparados mediante la reunión de los extremos generados) genera pequeñas deleciones que normalmente resulta en la modificación de los marcos abiertos de lectura de los genes, que genera una inactivación génica (*knockout*) que puede utilizarse en estudios de expresión y función proteica (WYMAN; KANAAR, 2006).

El mecanismo de edición génica mediante reparación dirigida por homología (HDR) es conocido desde hace más de dos décadas. Sin embargo, anteriormente se empleaban otros sistemas de corte, como TALENs, nucleasas de dedos de zinc y meganucleasas, los cuales se caracterizan por un diseño complejo y un desarrollo experimental laborioso (Zhu, 2022). Con la llegada de CRISPR-Cas9 rápidamente se pudieron desarrollar trabajos de edición génica en células humanas, levaduras, plantas, peces, entre otros (KARVELIS; SIKSNYS, 2022).

Se pueden citar diversas aplicaciones relacionadas a la edición génica con Cas9, que involucran la activación, introducción o silenciamiento de diferentes genes. Entre las áreas de investigación involucradas se encuentran el tratamiento de enfermedades y el mejoramiento de características vegetales en la agricultura. Como ejemplos relacionados a la salud se encuentran la creación de modelos de estudio para la terapia del cáncer, el análisis de la función génica y el tratamiento de enfermedades hereditarias como la fibrosis quística. En el área de la agricultura se pueden mencionar la mejora en la calidad

nutritiva vegetal y sabor de los alimentos, y la resistencia a pesticidas y enfermedades infecciosas (BHATIA et al, 2023).

Otra aplicación del sistema CRISPR-Cas9 es la utilización de una Cas9 con sus dominios nucleasa inactivados. Cuando se produce la inactivación de uno de ellos se produce una enzima nickasa, capaz de generar un corte individual en una hembra de DNA (Cas9n), que se permite realizar cambios precisos de un solo nucleótido sin introducir rupturas de doble cadena. Además reduce el riesgo de truncamientos cromosómicos, deleciones e inserciones no deseados, lo que lo hace preferible para la edición genética terapéutica y el modelado de enfermedades. Los enfoques que utilizan una única nickasa se consideran más seguros para aplicaciones clínicas, ya que evitan la genotoxicidad asociada con las roturas de doble cadena (ANZALONE et al., 2019).

La inactivación de ambos dominios nucleasa da lugar a una Cas9 catalíticamente inactiva (dCas9), la cual puede emplearse como bloqueador de la RNA polimerasa y de la DNA polimerasa, debido a su unión específica a secuencias diana. Además, la fusión de dominios con distintas actividades puede generar enzimas con distintas funciones. Por ejemplo, la unión de dominios activadores o represores de la transcripción permite la modulación de la expresión génica, en la que pueden utilizarse sistemas de segundos mensajeros para producir o reprimir la actividad. Asimismo, la fusión de dominios con actividad metilasa o acetilasa permite modular la epigenética molecular, lo que puede emplearse como un mecanismo adicional de regulación génica. Otra función puede ser la de rastreo molecular, que puede ser realizada por la fusión de la Cas9 a dominios reporteros (como proteínas fluorescentes). La edición génica de único nucleótido puede también producirse por la presencia de dominios desaminasas fusionados a la dCas9, que permiten cambios de C a T o de A a G (HSU; LANDER; ZHANG, 2014; KARVELIS; SIKSNYS, 2022).

2.3.2.2 Tipo V

Los sistemas CRISPR-Cas de tipo V no son muy difundidos en la naturaleza, representando un 10% de todos los sistemas CRISPR conocidos. La proteína Cas distintiva de este sistema es la Cas12, la cual tiene un único dominio nucleasa de tipo RuvC, semejante a aquel presente en las proteínas TnpB (transposasa B). En la última clasificación de 2025, fueron documentadas al menos 13 subtipos pertenecientes al tipo V

(V-A a V-Q), que se encuentran distribuidos mayormente en bacterias, pero ya se documentaron en arqueas (MAKAROVA et al., 2025).

La Cas12 presenta una estructura bilobular similar a Cas9, con los lóbulos REC y NUC igualmente. El lóbulo REC tiene la función de estabilizar la interacción del heteroduplex formado entre el crRNA y la secuencia objetivo, mientras que el lóbulo NUC presenta el dominio catalítico RuvC, que es el único conservado entre todos los subtipos pertenecientes al tipo V. Además dentro de NUC se encuentra el dominio PI, el dominio OBD (dominio de unión a oligonucleótidos, conocido también como *wedge domain*) y el dominio TSL (del inglés *target-strand loading*, acoplamiento de la hebra objetivo, anteriormente llamado dominio NUC).

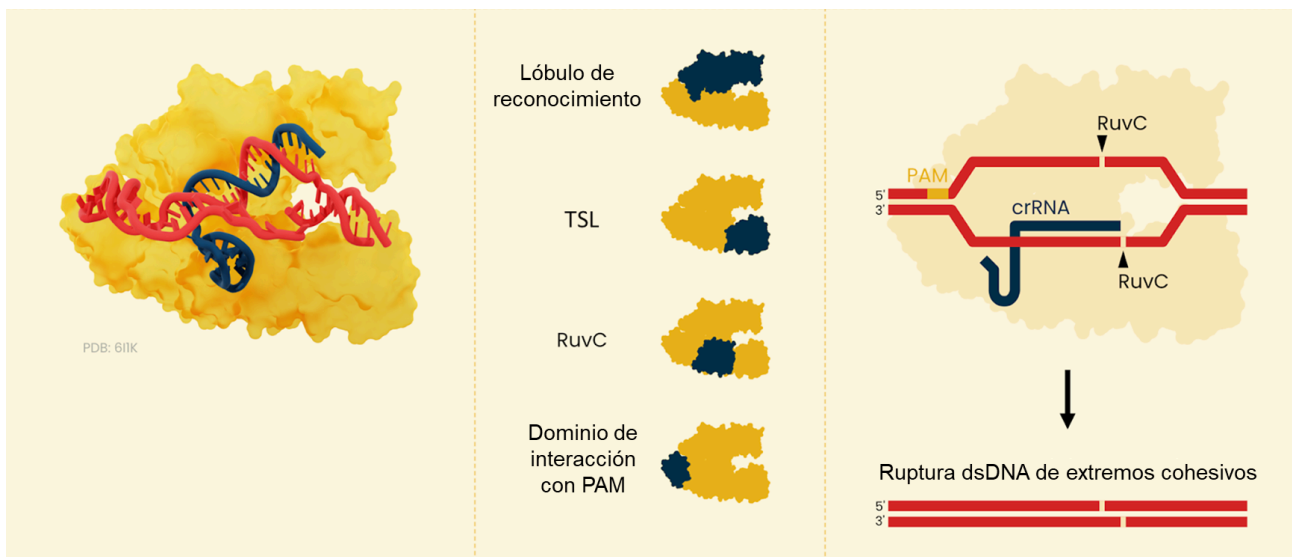
La adaptación de los sistemas de tipo V ocurre de manera similar a los otros sistemas CRISPR. El complejo Cas1-Cas2 es el encargado de la inserción de nuevos espaciadores en el arreglo CRISPR, acción que es ayudada por otras proteínas auxiliares como Cas4 (encargada de digerir los extremos de las secuencias de DNA que poseen el protoespaciadores para ajustarlos a las características de inserción) y/o otras endógenas del huésped. Según el subtipo de sistema, la combinación de proteínas requeridas varía. En el subtipo A, B, E, F y L se requieren a Cas1, Cas2 y Cas4; en el subtipo C, D y O solo a Cas1; mientras que en los subtipos G, H, I, J, K, M, N, P y Q no se observan proteínas de adaptación. En los subtipos V-C y V-D son integrados espaciadores de menor tamaño en relación a los otros subtipos (MAKAROVA et al., 2025).

Ya en la etapa de expresión, la transcripción del arreglo CRISPR genera el pre-crRNA que puede ser procesado directamente por Cas12 mediante el dominio RuvC (subtipo J), otro dominio nucleasa interno dentro del dominio OBD en la región 5' de las repeticiones (subtipos A e I), mediante la ayuda de tracrRNA y endonucleasas endógenas (subtipos B, E, F, G, K y L), o solo la presencia de scoutRNAs que procesan los extremos 3' de los espaciadores (en los subtipos C y D) (BECKETT; RAMACHANDRAN; BAILEY, 2022).

El mecanismo de interferencia de los sistemas tipo V pueden generar cortes en ssRNA, dsDNA o SSDNA (Imagen 8). Algunas variantes de Cas12 presentan actividad no específica de corte de ssDNA o ssRNA (pocas variantes conocidas). El reconocimiento de la secuencia objetivo ocurre en dsDNA con una región PAM presente. La interacción es mediada de manera similar que los sistemas de tipo II, donde se produce un bucle R, se reconoce la región semilla adyacente a PAM y luego se une toda la extensión del crRNA. La región PAM presenta generalmente una extensión de 2 a 4 nucleótidos, y se ubica

hacia el extremo 5' de la secuencia objetivo. El reconocimiento de PAM ocurre por los dominios OBD, Rec1 y PI. Luego inicia el traslado de la secuencia objetivo a la región en el medio de los lóbulos y ocurre la invasión del crRNA en la región semilla que genera un heteroduplex crRNA-DNA objetivo, desplazando a la hebra no objetivo y posicionándola en el dominio RuvC. El sitio activo de RuvC presenta una “tapa” que lo cubre, y la cual es abierta cuando el crRNA-DNA objetivo interactúan con los dominios del lóbulo REC. De este modo ocurre el corte de la hebra no objetivo en el extremo distal a PAM. Luego del corte, el producto distal a PAM es liberado de la enzima pero el residuo proximal a PAM permanece ligado. Esto genera inestabilidad estructural que expone la hebra objetivo al sitio catalítico, lo que causa posteriormente el corte de dicha hebra (BECKETT; RAMACHANDRAN; BAILEY, 2022).

Imagen 8 – Estructura del complejo efector del sistema CRISPR de tipo V y mecanismo de corte.



Fuente: Adaptado de DETURK, 2025.

Nota: Estructura bilobular del complejo Cas12-crRNA, observándose los dominios de unión a al heteroduplex crRNA-DNA objetivo (dominio de interacción a PAM y TSL) y el dominio catalítico (RuvC). A la derecha se observa el corte realizado por el complejo.

En algunas variantes de Cas12 como en los subtipos F y G puede ocurrir un corte independiente de PAM en ssDNA o ssRNA. En Cas12f fue observado que el corte ocurre corriente arriba de la región de complementariedad en ssDNA, requiriendo de un tracrRNA auxiliar y de una secuencia semilla interna en el medio de la región

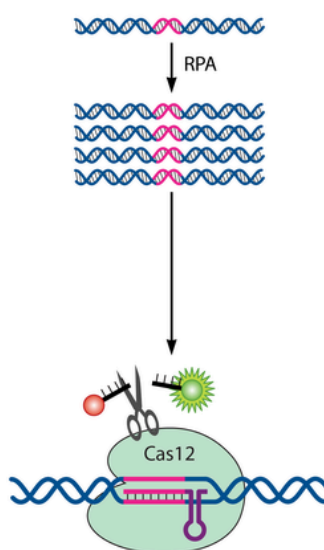
complementaria. En Cas12g solo fue observada la actividad catalítica con secuencias ssRNA, que también requiere de un tracrRNA (BECKETT; RAMACHANDRAN; BAILEY, 2022).

Luego del corte del dsDNA objetivo (corte en *cis*) y la liberación del producto distal a PAM, casi todas las variantes Cas12 (menos Cas12k) presentan una actividad catalítica colateral del dominio RuvC, generando cortes en moléculas ssDNA (corte en *trans*). Este corte puede activarse de forma robusta o ser ineficiente según el tipo de variante. La Cas12g es la única que además de reconocer objetivos de ssRNA, luego de ser activada puede clivar colateralmente ssDNA o ssRNA. La activación colateral del dominio RuvC ocurre debido a que luego de la unión del dúplex crRNA-dsDNA objetivo a la Cas12, la estructura que recubre el sitio catalítico cambia de conformación exponiéndolo, lo genera el corte del dsDNA objetivo. Sin embargo luego de la liberación del residuo distal a PAM, esta tapa no se reajusta, dejando la configuración activa y disponible para el corte de otras secuencias. La activación del corte en *trans* es provocada por el reconocimiento de PAM en moléculas dsDNA. Sin embargo este reconocimiento no es necesario cuando la secuencia complementaria a crRNA se encuentra en una molécula ssDNA. Diferencias de complementariedad entre el crRNA y el DNA objetivo disminuyen la tasa de corte en *trans*, mientras que si estas diferencias ocurren en secuencias semilla cercanas a PAM el corte en *trans* es inhibido. Este mecanismo es regulado por la alta producción de crRNAs, lo que permite que una vez utilizado uno para la detección de objetivos, ocurra un reemplazo rápido por otros disponibles, permitiendo la formación del bucle R nuevamente (PAUL; MONTROYA, 2020; CHEN et al., 2018).

Las aplicaciones de los sistemas CRISPR de tipo V son similares a aquellas encontradas en los otros sistemas. La edición genética altamente específica de algunas variantes como Cas12i generan un potencial de uso muy amplio, evitando efectos no deseados de cortes fuera del objetivo, que presentan algunos tipos de Cas9. Otra variante interesante es la Cas12c, la cual posee una secuencia de reconocimiento PAM de 5'-TN'-3', lo suficientemente corta para explorar un gran número de objetivos moleculares. La actividad en *trans* de Cas12 puede ser utilizada para diseñar sistemas de detección de ácidos nucleicos. El sistema de detección de DNA en *trans* dirigido con endonucleasas CRISPR (DETECTR) utiliza la Cas12, su crRNA guía y sondas fluorescentes (Imagen 9). La Cas12 encuentra su secuencia objetivo (ssDNA o dsDNA) guiado por el crRNA asociado y se une a ella causando un corte en una región específica. Este hecho provoca

la activación de la actividad de corte en trans no específica (corte colateral). Esa acción no específica permite el corte de sondas de ssDNA con un fluoróforo y un quéncher, lo que causa la emisión de fluorescencia y la detección de la señal. Este sistema de detección muestra ventajas de sensibilidad, especificidad y facilidad de manejo en relación a otros sistemas de detección como por ejemplo aquellos basados en PCR. (HILLARY; CEASAR, 2020).

Imagen 9 – Mecanismo de detección de ácidos nucleicos por la técnica DETECTR.



Fuente: MUSTAFA; MAKHAWI, 2021

Nota: Esquema del funcionamiento del sistema DETECTR, acoplado a una etapa de amplificación por RPA (amplificación por polimerasa recombinasa). Primero, la reacción RPA amplifica la secuencia objetivo (mostrada en rosa) generando múltiples copias de DNA de doble hebra. Estas copias amplificadas son posteriormente reconocidas por el complejo Cas12 guiado por crRNA, que se une específicamente a la secuencia complementaria. Una vez activado por la unión al DNA objetivo, Cas12 adquiere actividad de corte colateral, escindiendo indiscriminadamente sondas de DNA marcadas, lo que produce una señal detectable que indica la presencia del blanco genético.

Otro uso del método DETECTR es aquel que permite el diagnóstico de enfermedades virales. Un ejemplo es el diagnóstico del virus de la encefalitis japonesa. Normalmente la enfermedad es diagnosticada por RT-PCR, ELISA u otros ensayos, los cuales requieren de mucho tiempo de trabajo y son menos accesibles en países en vías de desarrollo. El uso del método DETECTR (y su variante OP DETECTR) presentado en el trabajo de Kwak et al. (2023) ofrece una alternativa rápida, de una alta sensibilidad y con menores falsos positivos o reacciones cruzadas en relación a otros métodos

mencionados (ELISA), llegando a detectar desde 10 moléculas por reacción. Además abre las puertas al desarrollo de test rápidos baratos y simples que pueden ser utilizados en lugares donde no existe una buena infraestructura laboratorial (KWAK; PARK; SONG, 2023).

2.3.2.3 Tipo VI

El sistema CRISPR-Cas de tipo VI fue descubierto mediante la búsqueda de marcos abiertos de lectura próximos al gen de Cas1 (debido a su alto nivel de conservación). En esta búsqueda fueron identificados dominios HEPN, que poseen actividad endoribonucleasa. La proteína que porta este dominio fue denominada Cas13 y constituye la proteína característica de este sistema CRISPR. Se trata de una nucleasa de ARN multidominio y de cadena única. Estructuralmente, Cas13 exhibe la arquitectura bilobular típica de los sistemas de clase 2, compuesta por los lóbulos REC y NUC. El lóbulo REC se encarga del reconocimiento del crRNA mientras que el lóbulo NUC contiene los dominios HEPN1 y HEPN2. El sistema tipo VI presenta 6 subtipos (VI-A a VI-F), siendo los subtipos VI-E y VI-F los más recientemente descritos. Las diferencias entre subtipos subyacen en la diferente combinación de conjuntos de genes *cas*, donde por ejemplo los subtipos VI-B y VI-C no presentan Cas1 ni Cas2 asociados para el proceso de adaptación (MAKAROVA et al., 2025).

El mecanismo de adaptación y expresión en este tipo de sistemas CRISPR no difiere demasiado de los otros sistemas CRISPR. La inserción está mediada principalmente por el complejo Cas1-Cas2 relativas al conjunto de genes *cas*, que en caso de no estar asociados al arreglo CRISPR de tipo VI (como en VI-B y VI-C), este es proveído por otros sistemas CRISPR. Se observó además en el subtipo VI-A la asociación de dominios RT con Cas1 para la incorporación de secuencias originales de RNA, similar a los sistemas de tipo III. En la etapa de expresión el arreglo CRISPR es transcrito a un pre-crRNA, que como en el tipo V con Cas12, es procesado por la misma proteína efectora del módulo de interferencia (Cas13). Inicialmente la interacción con el pre-crRNA ocurre en estructuras secundarias de las regiones repetitivas, lo genera cambios estructurales que permiten la activación del sitio catalítico de Cas13. El tamaño de un crRNA varía aproximadamente entre 53 y 60 nucleótidos, donde la secuencia derivada de la repetición tiene 30 nucleótidos y el espaciador entre 23 y 30 nucleótidos, donde en los subtipos VI-A, -C y -D las repeticiones se ubican hacia el extremo 5', y en el subtipo VI-B hacia el extremo 3' (MOLINA-SÁNCHEZ et al., 2024).

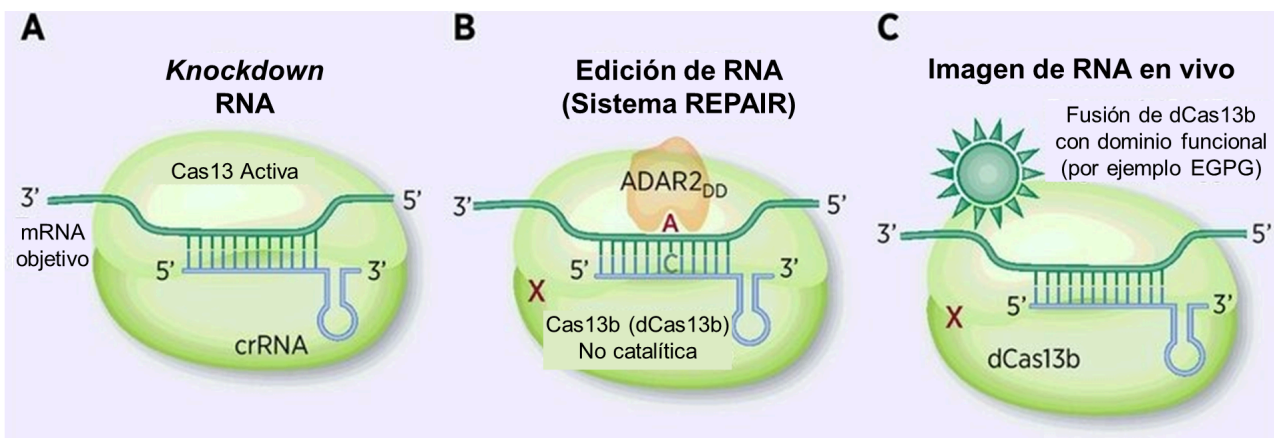
La etapa de interferencia está guiada por el complejo crRNA-Cas13, el cual reconoce secuencias de RNA objetivo. En ellas fue encontrada una región denominada secuencia adyacente al protoespaciador (PFS, del inglés *protospacer flanking sequence*) que puede encontrarse en los dos extremos 3' y 5', la cual tiene una función similar a la región PAM de los sistemas de detección de DNA, de modo a distinguir moléculas invasoras y endógenas. Si la región PFS (que puede ser de un solo nucleótido) presenta complementariedad con la repetición del crRNA, la actividad nucleasa de Cas13 es inhibida. Cabe resaltar que no todos los subtipos involucran el uso de una región PFS. Para la producción de un corte a secuencias de RNA objetivo se requiere además de la complementariedad de bases entre el crRNA y una región semilla, que normalmente se encuentra en la región central del protoespaciador. Errores de apareamiento de un nucleótido en la región semilla reducen la actividad de HEPN, mientras que dos errores la inhiben totalmente. Se observó que errores de apareamiento fuera de la región semilla inhiben el corte pero no la unión al objetivo (O'CONNELL, 2019).

Luego de la unión exitosa al objetivo se produce el corte de la secuencia de RNA, el cual puede ocurrir en A o U según el subtipo. La realización de trabajos sobre el estudio del corte de mRNAs de proteínas exógenas provocó la observación de que luego de este hecho ocurre el detenimiento del crecimiento o muerte celular, según la concentración de la secuencia objetivo. Esto sugirió que la Cas13 presenta una actividad ribonucleasa colateral posterior al corte específico de la secuencia objetivo, al igual que Cas12. Dicha actividad fue confirmada, lo que provee al sistema una defensa de tipo toxina-antitoxina o muerte por infección abortiva, lo que aumenta la sensibilidad de la interferencia impidiendo el escape de partículas mutantes. Esta actividad colateral ocurre debido a la naturaleza del sitio activo en HEPN, que se encuentra expuesto al medio. La separación del crRNA de la Cas13 permite la exposición del sitio activo a nuevos RNAs, contrario al sistema CRISPR de tipo II, donde Cas9 mantiene uno de los productos del corte, permaneciendo inactiva (ABUDAYYEH; GOOTENBERG, 2022).

Existen proteínas asociadas a algunos sistemas CRISPR de tipo VI, como por ejemplo algunas de dominios transmembrana involucrados en la degradación o captación de DNA exógenos en el subtipo VI-B. Algunas de estas proteínas son Csx27 y Csx28 (esta última presenta un dominio HEPN), que pueden inhibir o reforzar el mecanismo de interferencia mediante la interacción con la proteína Cas13. En el subtipo VI-D la interferencia es potenciada por la proteína WYL, promoviendo la actividad colateral de Cas13 (MAKAROVA et al., 2019).

Las aplicaciones de los componentes del sistema CRISPR de tipo VI son muy variadas, en el ámbito de trabajos de manipulación de RNA (Imagen 10). Una de ellas es la producción de *knockdown* génico (silenciamiento parcial temporal), que mediante la adición de señales de localización nucleares puede ser utilizado para el estudio de la expresión génica en múltiples genes en simultáneo. La utilización de Cas13 se mostró más eficiente para el silenciamiento de genes que la técnica de iRNA, siendo más específica y con menos cortes fuera del objetivo. En relación a la actividad colateral, fue observado que en algunas células eucariotas esta no ocurre (como en algunas células humanas) mientras que en otras sí se observa (células de glioma). Esto podría deberse a que el ambiente citoplasmático eucariota es más denso y con mecanismos de protección a moléculas de RNA. El uso del corte programado por Cas13 puede utilizarse en la terapia oncogénica, degradando mRNAs de oncogenes activos esenciales de forma específica sin afectar a células sanas. Además el uso en terapias antivirales mediante el transporte de sistemas de tipo VI permite la eliminación de virus de RNA como el SARS-CoV-2 (ABUDAYYEH; GOOTENBERG, 2022).

Imagen 10 – Aplicaciones de Cas13.



Fuente: Adaptado de GRANADOS-RIVERÓN; AQUINO-JARQUIN, 2018.

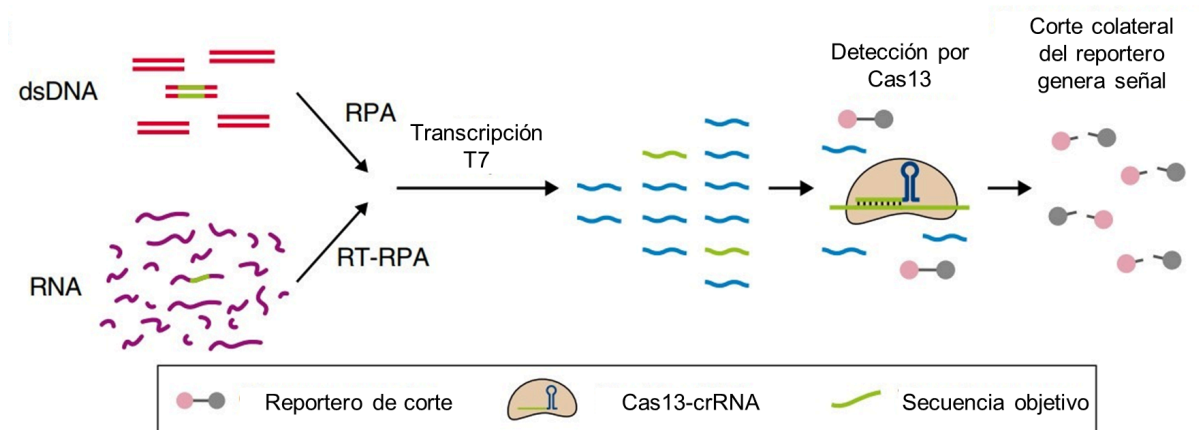
Nota: La imagen ilustra tres aplicaciones del sistema Cas13 en la manipulación del RNA. A) Cas13 activa reconoce un mRNA objetivo mediante un crRNA complementario y lo degrada, lo que permite realizar *knockdown* génico. B) Una versión inactiva de Cas13b (dCas13b) se fusiona a la desaminasa ADAR2 para formar el sistema REPAIR, que edita RNA al convertir selectivamente una adenina en inosina sin cortar la molécula. C) dCas13b se fusiona a un dominio funcional (proteína fluorescente) para visualizar y seguir en tiempo real moléculas individuales de RNA en células vivas.

Otros usos de la actividad programable de Cas13 incluyen la modulación del

splicing alternativo, la localización de moléculas de RNA, edición de base única y diseño de sistemas de detección. Estas aplicaciones requieren del uso de una Cas13 inactiva (dCas13) semejante a dCas9. En lo referente a la manipulación del splicing alternativo, mediante dCas13 se puede mediar la inclusión o exclusión de secuencias intrónicas o exónicas, la cual se produce por programar la unión de proteína en sitios de empalme (secuencias aceptoras o donadoras), de este modo manteniendo o excluyendo fragmentos del mRNA. La localización molecular de RNAs puede producirse mediante la ligación de una dCas13 fusionada a proteínas cromogénicas como GFP, que con la utilización de varios tipos de señales se pueden marcar diferentes moléculas. Por otro lado, la edición de secuencias de RNA puede generarse mediante el empleo de dCas13 fusionada a desaminasas como ADAR1 o ADAR2, que modifican bases nitrogenadas (por ejemplo de A a I, que es reconocida como G). De esta forma surgen técnicas como REPAIR (del inglés *RNA editing for programmable A to I replacement*, edición de RNA para la sustitución programable de A por I) o RESCUE (*RNA editing for specific C to U exchange*, edición de RNA para el intercambio específico de C por U) (COX et al., 2017; ABUDAYYEH; GOOTENBERG, 2022).

Del mismo modo que el empleo de Cas12 para detección de secuencias DNA, la utilización de Cas13 puede permitir evaluar la presencia de moléculas de RNA específicas en una muestra. La técnica denominada SHERLOCK (del inglés *Specific High-sensitivity Enzymatic Reporter un-LOCKing*, desbloqueo enzimático de reporteros específico y de alta sensibilidad) utiliza un procedimiento parecido al mencionado en la técnica DETECTR, en el cual la activación del corte colateral de secuencias mediado por el reconocimiento de un RNA objetivo causa la fragmentación de un oligonucleótido marcado fluorescentemente (sistema quencher-fluoróforo), que permite el reconocimiento de la señal emitida y la confirmación de la presencia de la molécula objetivo (Imagen 11). Mediante la incorporación de Cas12 y un paso previo de amplificación con *primers* poseedores de la secuencia del promotor T7, se puede expandir su uso a detección de moléculas de DNA. Estas metodologías otorgan una herramienta rápida, sensible y barata sin la utilización de equipamientos ni procedimientos complejos, pudiendo ser utilizada en el diagnóstico de varios tipos de enfermedades (GOOTENBERG et al., 2018; MYHRVOLD et al., 2018).

Imagen 11 – Mecanismo de detección de ácidos nucleicos por la metodología SHERLOCK.



Fuente: Adaptado de ABUDAYYEH; GOOTENBERG, 2022.

Nota: Detección sensible de ácidos nucleicos mediante la técnica SHERLOCK, donde se combina una etapa de preamplificación del DNA objetivo con una transcripción posterior mediada por T7.

2.3.3 Sistemas Emergentes Y Variantes Recientes

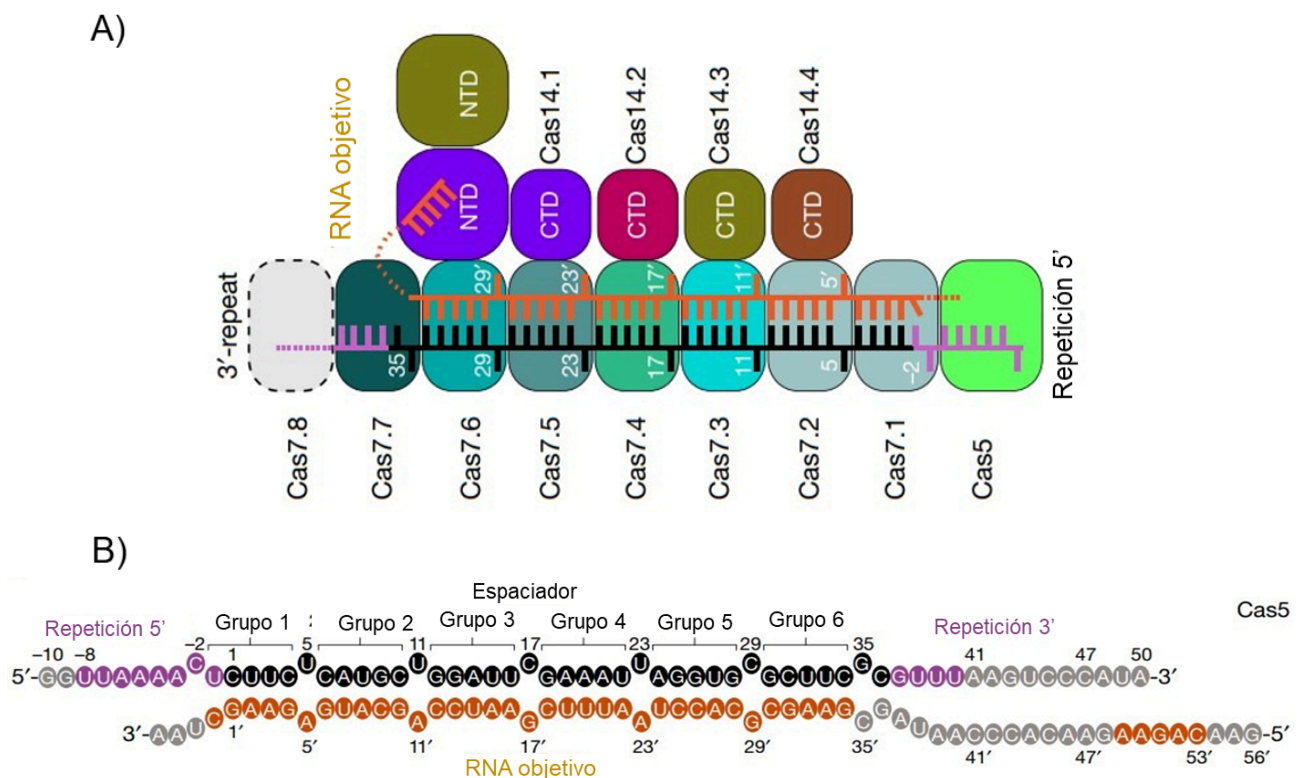
2.3.3.1 Tipo VII

En el año 2024 fue publicado un trabajo por Yang et al. (2024) en el que se describe un nuevo tipo de sistema CRISPR: el tipo VII. Este sistema pertenece a la clase 1, cuya actividad en la interferencia está mediada por un complejo efector compuesto por Cas5, Cas7 y Cas14 (la proteína Cas distintiva del tipo VII), el cual corta moléculas de RNA de manera específica. Debido al reciente anuncio de este sistema, son pocas las características descritas. En relación al proceso de adaptación, no fueron descritos genes de proteínas Cas asociados al arreglo CRISPR de tipo VII, dejando una brecha de conocimiento en relación a la inserción de nuevos espaciadores.

Para la etapa de la expresión, se describe la actuación de Cas6 en el procesamiento del pre-crRNA, generando crRNA con secuencias derivadas de repeticiones en sus 2 extremos 3' y 5' (de 4 y 8 nucleótidos de longitud respectivamente) y un espaciador de 36 nucleótidos. La formación de la ribonucleoproteína muestra que la proteína Cas5 se une al extremo 5' del crRNA, mientras que la Cas7 forma un filamento de subunidades que recubren la extensión total del crRNA (que se encuentra catalíticamente inactiva, al contrario de otros sistemas que presenta actividad RNAsa). Luego de la unión del RNA objetivo, se recluta a la Cas14, y el heteroduplex formado

entre el crRNA y RNA objetivo presenta el volteo de nucleótidos individuales cada 6 pares de bases en la zona del espaciador (Imagen 12). La Cas14 actúa como tetrámero, en el que cada subunidad está compuesta por un dominio N-terminal, un dominio en la región media (dominio medio conector) y C-terminal. Fue observado que el dominio C-terminal es el que permite la unión de la Cas14 al complejo Cas5-Cas7, el dominio medio permite la unión de las subunidades de Cas14 entre sí, y el dominio N-terminal presenta actividad catalítica, la cual depende de un motivo β -CASP, homólogo al dominio catalítico de la RNAsa J, que corta moléculas de RNA en otros sistemas CRISPR. La escisión de la hebra de RNA ocurre de manera secuencial y depende de una secuencia adyacente al protoespaciador (PFS) en el extremo 5' del RNA objetivo. Si dicha secuencia es complementaria a una región de la repetición que se encuentra en el extremo 3' del crRNA se producen 3 cortes consecutivos del objetivo, mientras que si no hay complementariedad se producen solo 2 cortes. Este tipo de proceder parece depender de los nucleótidos volteados, debido a que fue observado que la complementariedad de bases en la región PFS genera un nuevo volteo de bases adicional que determina el modo de corte del complejo, debido a cambios conformacionales de la estructura que permite repositionar el sitio catalítico (YANG et al., 2024; MAKAROVA et al., 2025).

Imagen 12 – Estructura del complejo efector del sistema CRISPR de tipo VII y del heteroduplex crRNA-RNA objetivo formado.



Fuente: Adaptado de YANG et al., 2024.

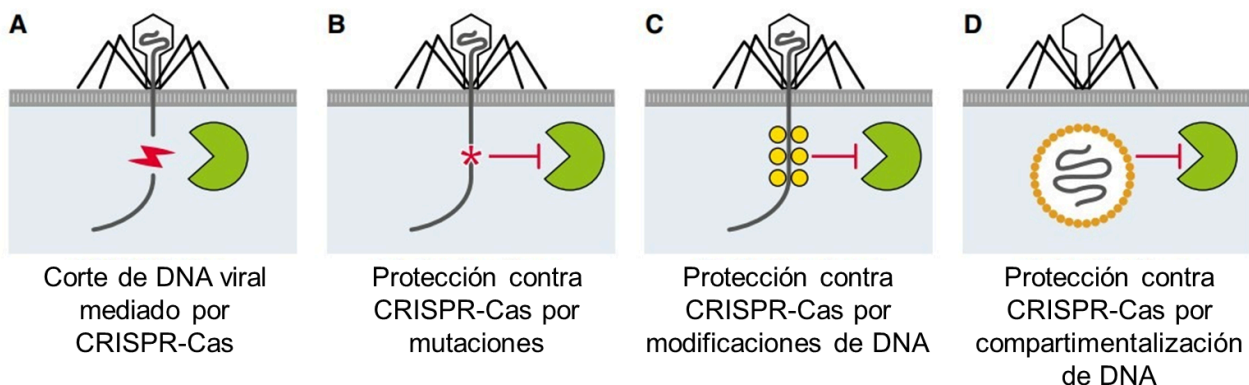
Nota: A) Representación esquemática del complejo Cas5-Cas7-crRNA-CTR-Cas14 mutante (debido a la duplicación del dominio N-terminal) en un estado de unión al sustrato, comprobando la función de cada dominio. B) Representación esquemática del dúplex crRNA-RNA objetivo en un estado de unión al sustrato.

En este tipo de sistema CRISPR no fue observada una actividad catalítica colateral, lo que permite diseñar herramientas de manipulación de RNA más precisas. Además, el tamaño más compacto de los componentes del tipo VII permitirían el desarrollo de sistemas de transporte vesiculares de manera más simple, lo que genera un potencial de aplicaciones biotecnológicas interesante (YANG et al., 2024).

2.3.3.3 Sistemas anti-CRISPR

Así como los procariontes desarrollaron mecanismos de defensa frente a los EGMs, como el sistema CRISPR-Cas, algunos de estos últimos evolucionaron estrategias para evadir las tácticas de represión ejercidas por dicho sistema (Imagen 13). Entre estos mecanismos se encuentran las mutaciones en secuencias fundamentales para el reconocimiento y escisión de la secuencia objetivo (como la secuencia semilla y región PAM). Otras maneras de evitar la acción de CRISPR es por la modificación de las bases nitrogenadas y la compartimentalización del material genético, que evitan el reconocimiento de la maquinaria efectora. También la evasión puede ocurrir por la inhibición de las nucleasas Cas, la cual es causada por proteínas denominadas inhibidores anti-CRISPR (Acr) de diversos fagos o plásmidos, que tienen la función de interferir en alguna de las etapas del mecanismo CRISPR como la síntesis de proteínas Cas, la carga del crRNA en el complejo efector, la unión al DNA objetivo o la activación catalítica (DEVEAU et al., 2008).

Imagen 13 – Mecanismos de evasión a CRISPR.

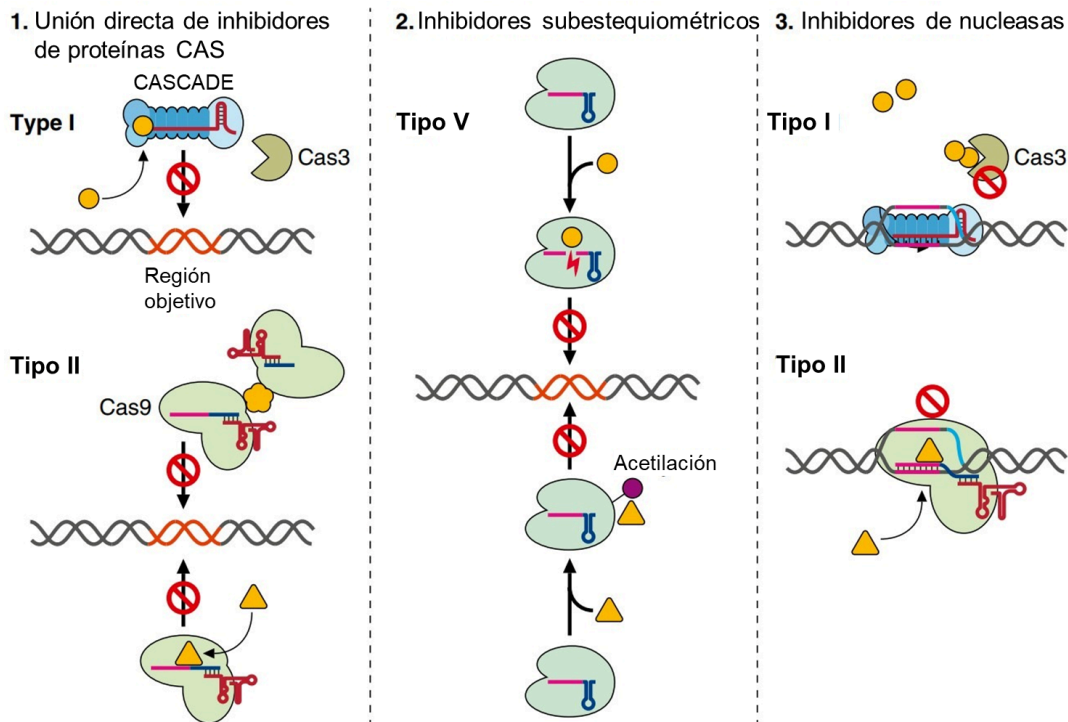


Fuente: Adaptado de ZHANG; GOVINDARAJAN; BONDY-DENOMY, 2022.

Nota: A) El DNA del fago es escindido por una nucleasa CRISPR (defensa efectiva del sistema). B) Mutaciones puntuales en el genoma del fago que debilitan o impiden la unión Cas-crRNA a la secuencia objetivo y evitan el corte. C) Modificaciones químicas en las bases del DNA (círculos amarillos) bloquean la unión o la escisión por Cas. D) Estructuras proteicas del fago protegen su DNA frente a nucleasas CRISPR.

Un tipo de inhibición a CRISPR-Cas ocurre por unión a proteína Cas que puede causar la inactivación de su actividad nucleasa o evitar el reconocimiento de la secuencia objetivo (Imagen 14). Las proteínas AcrIF1 y AcrIF2 son ejemplos de este mecanismo, el cual actúa contra el sistema de tipo I-F. AcrIF1 puede inducir cambios conformacionales al unirse al esqueleto del complejo, lo que impide el acceso del DNA objetivo al crRNA. AcrIF2 puede simular propiedades eléctricas del DNA objetivo por su distribución de cargas negativas en su superficie, que lo hacen un competidor directo por el sitio del DNA objetivo al sitio de reconocimiento. Otro tipo de mecanismo de inhibición es aquel causado por proteínas Acr que actúan contra el sistema de tipo II. Por ejemplo AcrIIC3 se une a la proteína Cas9 y produce su dimerización, lo que limita el acceso del DNA objetivo al sitio de unión. AcrIIC2 por otro lado, puede evitar la interacción de la proteína efectora con el crRNA mediante el contacto con zonas estructurales como la hélice puente. La interacción con dominios de interacción a PAM también puede ser otro mecanismo inhibitorio, y un ejemplo de proteína Acr que actúa de esta forma es AcrIIA4. Otros mecanismos de acción, encontrados en Acr contra el tipo V, son la liberación del DNA objetivo unido y el bloqueo del reciclaje de la proteína efectora mediante la unión permanente (por ejemplo AcrVA4), la degradación del crRNA (AcrVA1 que presenta actividad RNAsa) y la modificación postraduccional de las proteínas efectoras (como la acetilación causada por AcrVA5). En relación a la inhibición de los sistemas de tipo III, esta puede ser causada por la degradación del segundo mensajero necesaria para la activación del corte colateral (HWANG; MAXWELL, 2019; ZHANG; GOVINDARAJAN; BONDY-DENOMY, 2022).

Imagen 14 – Mecanismos de evasión a CRISPR mediados por proteínas anti-CRISPR.



Fuente: Adaptado de ZHANG; GOVINDARAJAN; BONDY-DENOMY, 2022.

Nota: Los mecanismos de anti-CRISPR (Acr) caracterizados incluyen proteínas que se unen directamente a las proteínas Cas e inhiben su función. 1) Inhibidores como enzimas que actúan catalíticamente. 2) Acrs que bloquean dominios o subunidades nucleasas específicas.

Es importante mencionar que estos sistemas Acr también juegan un papel evolutivo en la adquisición de características ventajosas para los procariontes huéspedes. Existen algunos organismos que utilizan estos sistemas para modular la actividad del sistema CRISPR-Cas. La presencia de profagos dentro del genoma puede tener su beneficio en relación a que estos ayudan a aumentar el fitness bacteriano a causa de su propia sobrevivencia, además de proteger al huésped de otros organismos competidores. Por lo tanto, la inhibición parcial del sistema CRISPR causada por la actividad de los componentes Acr ayuda a generar variabilidad genética que permita la sobrevivencia bacteriana. Otro ejemplo es la conservación de plásmidos exógenos portadores de resistencia antimicrobiana, en la cual su conservación es fundamental para la propagación de la especie en ciertos ambientes. Adicionalmente, la expresión de estos sistemas Acr puede generar un desvío de la maquinaria energética celular que impide la transcripción de genes esenciales como aquellos de proteínas estructurales virales debido a que

normalmente los promotores asociados a las proteínas Acr presenta una alta afinidad a las polimerasas, por lo que la regulación de su expresión se media por genes asociados a Acrs que reprimen la producción de estos componentes luego de una generación inicial de los inhibidores Acr (ZHANG; GOVINDARAJAN; BONDY-DENOMY, 2022).

2.4 DISCUSIÓN EVOLUTIVA: PROBABLE ORIGEN EN LOS SISTEMAS DE DEFENSA Y TRANSPOSICIÓN HORIZONTAL DE ELEMENTOS CAS.

La emergencia de los sistemas CRISPR ocurre en medio de una constante carrera armamentística entre los organismos procariontas y agentes invasores. La enorme diversidad de EGM y mecanismos de infección permitió que las bacterias y arqueas desarrollaran una amplia gama de herramientas moleculares para hacer frente a estos ataques, como lo es el sistema CRISPR-Cas. En este trabajo fue mencionado que este mecanismo de defensa presenta 3 módulos, de los cuales dos son los más importantes: la adaptación y la interferencia. La adaptación requiere de proteínas Cas con actividad nucleasa que permitan la integración de secuencias derivadas de invasores para el establecimiento de una memoria celular. En este módulo están involucradas las proteínas Cas1 (con actividad endonucleasa), Cas2 (con función estructural), y proteínas auxiliares como Cas3, Cas4, Cas9 y RT. En líneas generales este mecanismo se encuentra bastante conservado entre sistemas CRISPR, presentando una arquitectura uniforme y relativamente simple. En contraste, el módulo de interferencia en el que actúa un complejo efector presenta una enorme diversidad y variación, generando así la clasificación actual de los sistemas CRISPR-Cas (MAKAROVA; WOLF; KOONIN, 2022).

Estudios filogenéticos revelaron que la evolución de los sistemas CRISPR se debe en parte a la contribución de varias clases de EGM, principalmente en el módulo de adaptación. El módulo de interferencia presenta más dificultades de seguimiento evolutivo por su amplia variedad. En este contexto, no existe una proteína Cas universal que pueda ser utilizada como marcador filogenético, en parte debido a la evolución semi-independiente de los módulos. La clasificación general permite distinguir dos clases de sistemas CRISPR: la clase 1 en la que el módulo efector de interferencia está constituido por diferentes unidades, y la clase 2 en la que este módulo efector se compone de una única proteína multidominio. Luego cada clase se divide en tipos de sistemas, según las características estructurales del módulo efector. Cada tipo se subdivide en subtipos según la organización del locus y proteínas Cas específicas.

Ejemplos de estas características son la forma de maduración del crRNA (por medio de un complejo CASCADE, RNAsa III, presencia de tracrRNA, presencia de proteína efectora única) (KOONIN; MAKAROVA, 2019).

La primera observación en relación a la estructura de los complejos de adaptación es que todos ellos requieren de la presencia de Cas1 y regiones repetitivas, destacándose un posible intercambio de estos componentes entre diferentes tipos de sistemas CRISPR. Se observa que los genes *cas* y el arreglo CRISPR del módulo de adaptación permanecen fijos, mientras que aquellos genes del módulo de interferencia son mayormente intercambiados dentro de un mismo sistema y entre sistemas. Un ejemplo de esto es la presencia de actividad retrotranscriptasa (RT) del tipo III, que está relacionada con varios módulos efectores de diferentes subtipos. Este intercambio ocurre posiblemente como forma de escape frente a proteínas Acr que agentes invasores desarrollan como métodos de evasión de sistemas CRISPR (KOONIN; MAKAROVA, 2019).

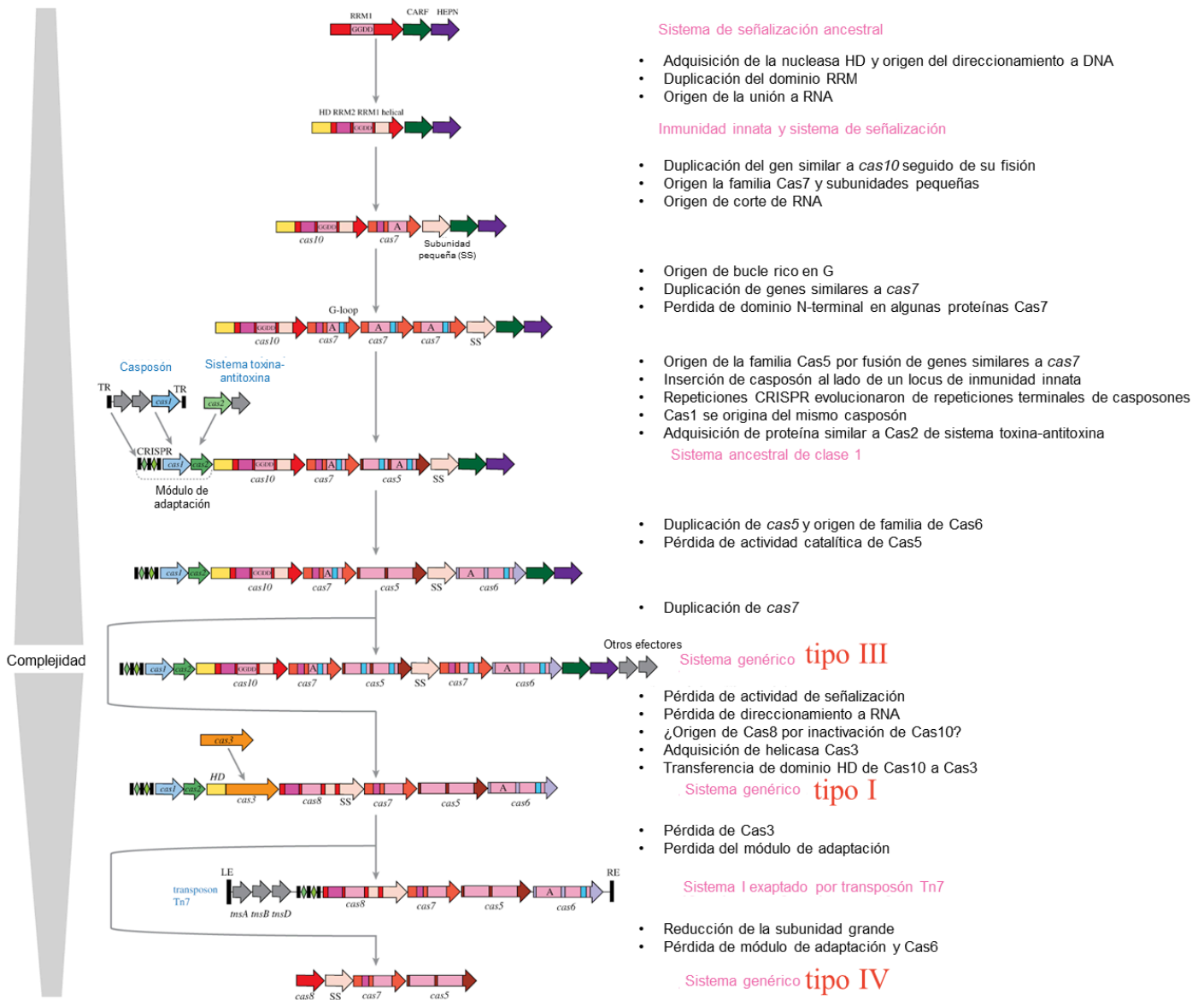
El estudio de estructuras homólogas del componente más conservado entre sistemas, Cas1, mostró que los genes de algunos de estos se encuentran flanqueados por repeticiones invertidas, lo que claramente apunta a elementos transponibles relacionados con la previamente mencionada Cas1 y con DNA polimerasas de la familia B. Esta relación se sustenta en la notable similitud entre los mecanismos de inserción mediados por Cas1 en los sistemas CRISPR y los procesos de transposición. Por lo tanto estos transposones que requieren de Cas1 como integrasa fueron denominados casposones, que debido a la presencia de la DNA polimerasa parecen ser autoreplicables. Estos casposones fueron encontrados en la gran mayoría de arqueas y en algunas bacterias, e incluso en genomas virales donde el casposón codifica para una proteína de la cápside viral (caspovirus). Por lo tanto, el origen del módulo de adaptación posiblemente ocurre a partir de casposones a los cuales posteriormente se le asocian otros genes *cas* (como Cas4 y Cas2). Las repeticiones y la secuencia *leader* posiblemente evolucionaron de repeticiones invertidas posiblemente replicadas de un casposón ancestral. Este casposón podría haberse insertado cerca de un locus relacionado a la defensa inmune bacteriana, siendo posteriormente inmovilizado y eliminados genes como el de la DNA polimerasa, que luego de la asociación con transcritos de genomas exógenos permitieron la formación del módulo efector (KOONIN; MAKAROVA, 2019).

En los sistemas de clase 1, fue observado que los módulos efectores presentan

un ancestro común, sobre todo los tipos I y III (Imagen 15). En su arquitectura se observa la presencia de una proteína esqueleto (Cas7), de una única Cas5 y de las denominadas subunidades grandes y pequeñas. La homología entre secuencias génicas es muy baja, pero se observan relaciones estructurales significativas. Por ejemplo la subunidad grande del tipo III (Cas10) y del tipo I (Cas8) no presentan casi ninguna homología, pero la estructura del esqueleto Cas7-Cas5 muestra la existencia de un ancestro común. Todos estas proteínas pertenecen a la superfamilia RAMP (del inglés *Repeat-Associated Mysterious Protein*, proteínas misteriosas asociadas a repeticiones), por lo que el camino evolutivo pudo iniciar desde una proteína ancestral RAMP con RRM. Además las subunidades pequeñas presentan semejanza con el extremo C-terminal de Cas10, lo que indica una duplicación y fisión génica de este componente, que además generó una Cas7 ancestral. La posterior fusión de dos genes de Cas7 dió lugar a la Cas5, que posteriormente fue duplicada generando a la Cas6. Debido a que algunas RAMPs presentan actividad nucleasa (Cas5, Cas7 y Cas6), no se descarta que la proteína RAMP ancestral sea una RNAsa, lo que generaría algunas ideas de orígenes independientes debido a los diversos residuos que componen la actividad catalítica (TANG, 2019; KOONIN; MAKAROVA, 2019).

En relación a la presencia de dominios CARF y HEPN que inducen la inactivación metabólica o muerte celular, se induce que el ancestro común de los complejos efectores de sistemas CRISPR de clase 1 podría estar relacionado a sistemas de respuesta al estrés, que eran activados por la presencia de segundos mensajeros (como cOA). A partir de una proteína Cas10 ancestral pequeña con presencia de CARF y HEPN se generó la separación de estos dominios, y mediante duplicaciones e inserciones se adquirió la presencia de dominios DNAsa como HD, que participaron en la defensa celular innata. La posterior pérdida de señalización por inactivación de los dominios señalizadores permitió la especialización en objetivos de DNA, que luego de su pérdida nuevamente dio lugar a la Cas8. La Cas3 se supone que apareció luego mediante una adquisición externa. Los sistemas de tipo IV que posteriormente fueron reclutados por EGM como componentes auxiliares surgen finalmente luego de la pérdida de Cas3, Cas6 y el módulo de adaptación (TANG, 2019).

Imagen 15 – Relación evolutiva y orígenes de los sistemas CRISPR de clase 1.



Fuente: Adaptado de KOONIN; MAKAROVA, 2019.

Nota: Escenario hipotético del origen y evolución de los sistemas CRISPR-Cas de clase 1, derivados de un sistema ancestral de señalización. Se describe cómo se dio lugar a los sistemas actuales de tipo III y tipo I. También se ilustra la evolución reductiva que originó los sistemas de tipo IV y las variantes minimalistas de tipo I reclutadas por transposones Tn7. A la derecha se resumen los eventos evolutivos clave, entre ellos el motivo catalítico “GGDD” del dominio ciclasa/polimerasa de *Cas10* y el dominio RRM catalíticamente activo (“A”) de una proteína RAMP.

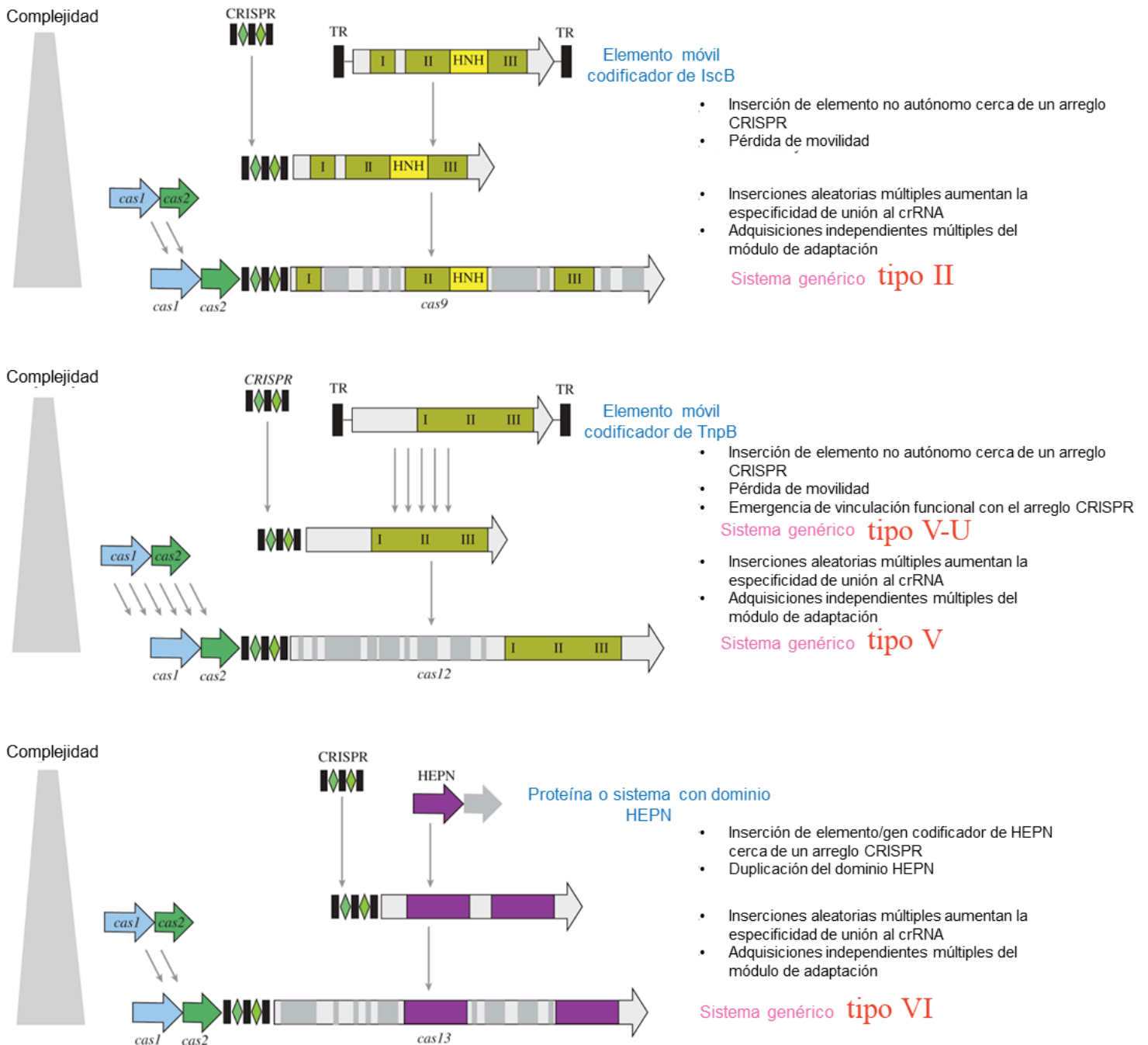
En relación al origen evolutivo de la clase 2, se observa que las proteínas efectoras se asemejan a nucleasas que se encuentran en diferentes EGM (Imagen 16).

Los tipos II y V comparten el dominio semejante a RuvC, que se encuentra en otras proteínas. Además la estructura bilobular, el tamaño y la forma de acomodar al crRNA son similares. La Cas9 y Cas12 podrían tener un origen común a partir de transposones no autónomos que codifican TnpB, de forma independiente a partir de la misma familia proteica (MAKAROVA et al., 2020; SHMAKOV et al., 2017).

Además Cas9 podría estar relacionada a otra familia de transposones denominada ISC que presentan la inserción de un dominio HNH en Tnp. En relación a Cas12, puede rastrearse mediante algunas variantes no descritas (U-V) la evolución a partir de transposones codificantes de TnpB que se insertaron coincidentemente al lado de un arreglo CRISPR, lo que con posteriores duplicaciones y recombinaciones internas generó la diversidad de sistemas de tipo V. La adquisición del módulo de adaptación entre la clase 1 y 2 parece haber ocurrido de manera distinta (SHMAKOV et al., 2017).

Otro factor que contribuyó a la formación de sistemas CRISPR-Cas actuales son los módulos toxina-antitoxina (donde el tipo II TA es el más común). En este sistema la antitoxina es inestable y al ser eliminada por proteólisis activa a la toxina que presenta actividad RNasa no específica. La movilidad de estos módulos por EGM generó una “adicción celular” a ellos debido a que la pérdida del plásmido portador generaba perjuicios. Además se observa que muchos loci toxina-antitoxina fueron introducidos en los genomas procariontes, que inducen una defensa poblacional mediante muerte celular y dormancia. Cas2 se estima que evolucionó a partir de estos módulos, en particular de la familia de interferasas VapD, la cual pierde su sitio catalítico. Otro dominio adquirido por sistemas de toxina-antitoxina es el HEPN, encontrado en el tipo VI. Estos dominios son muy abundantes, por lo que podrían tener un origen independiente del encontrado en el tipo III (KOONIN; MAKAROVA, 2019).

Imagen 16 – Relación evolutiva y orígenes de los sistemas CRISPR de clase 2.



Fuente: Adaptado de KOONIN; MAKAROVA, 2019.

Nota: Escenario hipotético sobre el origen de los efectores CRISPR-Cas de clase 2 a partir de elementos genéticos móviles. Los sistemas de tipo II y tipo V habrían evolucionado desde transposones no autónomos, mientras que los de tipo VI derivarían de un sistema de defensa parecido a un módulo toxina-antitoxina. IscB y TnpB se proponen como los ancestros de los efectores Cas9 (tipo II) y Cas12 (tipo V), respectivamente. Las inserciones que podrían haber contribuido a aumentar la especificidad y eficiencia de estos efectores se representan como rectángulos grises. Los motivos catalíticos I, II y III forman

conjuntamente el sitio activo de la nucleasa tipo RuvC, y los TR corresponden a las repeticiones terminales.

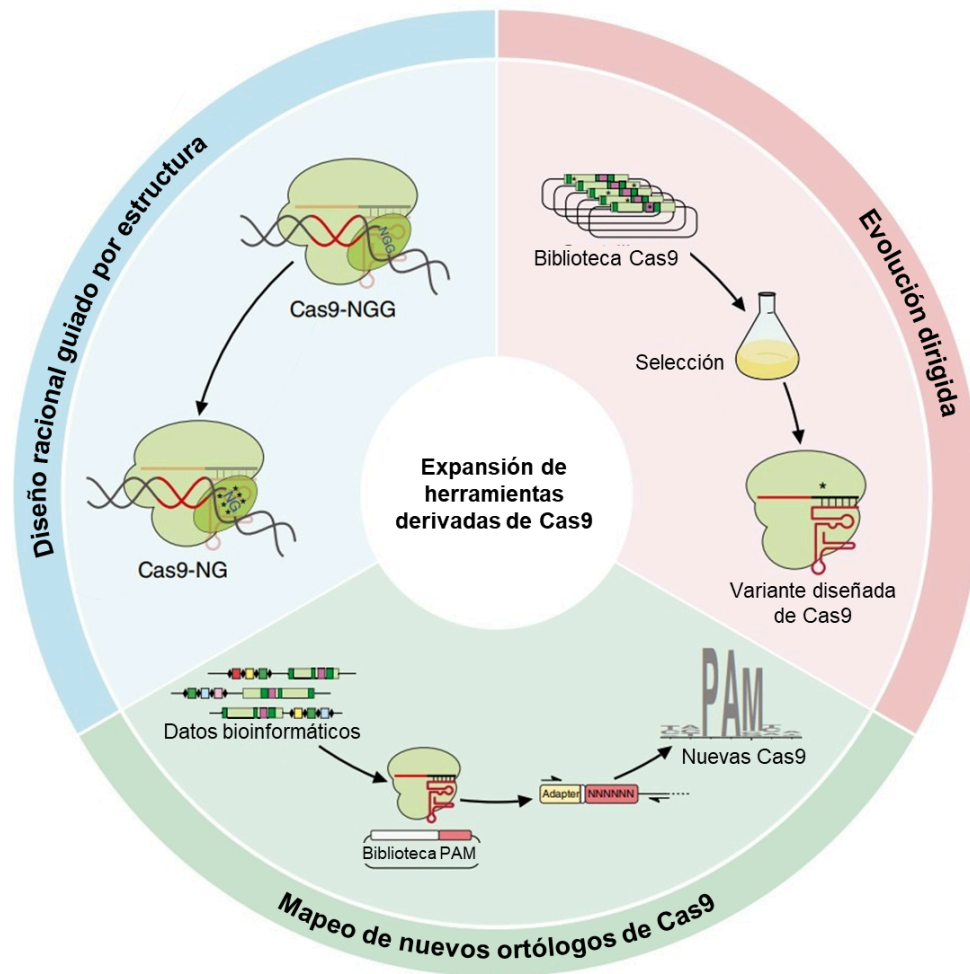
2.5 TENDENCIAS ACTUALES: MINIATURIZACIÓN Y ESPECIFICIDAD AUMENTADA

Desde la primera demostración de que la edición genética era posible con Cas9, su uso se extendió por todo el mundo y hasta hoy en día sigue siendo la nucleasa más utilizada para este propósito. Sin embargo, existen algunas limitaciones que obstaculizan su uso. La primera de ellas es la actividad de corte fuera del objetivo debido a la tolerancia de errores de complementariedad de bases entre el crRNA y el DNA objetivo que puede generar mutaciones no deseadas. Además la necesidad de regiones PAM limita su uso en aplicaciones de modificación genética. Otra dificultad encontrada es en relación a la implementación clínica, específicamente en el transporte de los sistemas CRISPR-Cas9 a los tejidos objetivo. Esta estrategia involucra el uso de vectores derivados de adenovirus que tienen una capacidad de carga limitada, lo podría dificultar el empaquetamiento del complejo Cas9-crRNA debido al tamaño de este. Asimismo, la inmunogenicidad de Cas9 constituye un obstáculo para el avance de las aplicaciones de edición genética en humanos que emplean esta proteína (KARVELIS; SIKSNYS, 2022).

La solución a estos problemas requiere la modificación de estructura y función de Cas9, la cual se logra por diferentes métodos (Imagen 17). Uno de ellos es la ingeniería de proteínas, en la que se utilizan enfoques basados en el diseño racional estructural. De este modo la modificación de aminoácidos en la estructura primaria referente a dominios de ligación al crRNA y al DNA objetivo permite la reducción de actividad fuera del objetivo, la reducción de la longitud de las secuencias PAM a requerimientos más simples (por ejemplo reduciendo de 3 nucleótidos a 1 nucleótido) y la generación de variantes con diferentes regiones PAM. Ejemplos de variantes diseñadas por este método son la variante RHA, eSpCas9 1.1 y SpCas9-HF1. Otra aproximación es el mapeo de ortólogos naturales, los cuales presentan mayor especificidad que la variante mayormente difundida (SpCas9). El uso de herramientas bioinformáticas permite la exploración eficiente de bibliotecas de variantes de Cas9 con distintos requerimientos de PAM, las cuales presentan diferencias bioquímicas entre sí. Ejemplos de variantes halladas por este método son SaCas9, St1Cas9 y CjCas9. Otro enfoque es la utilización de evolución directa, en la cual a partir de la variante SpCas9 se utilizan métodos de selección positivos y negativos a partir de una librería de genes Cas9 para encontrar otras variantes con especificidad aumentada y diferentes tipos de secuencias PAM requeridas,

como por ejemplo la variante VQR, EvoCas9 y SniperCas9. Mediante estos métodos también es posible diseñar ortólogos más pequeños que puedan caber dentro de las vesículas de transporte. Ejemplos de estos son Nm1Cas9 y Nm2Cas9, las cuales ya fueron eficientemente transportadas a las células objetivo mediante vectores derivados de adenovirus (LI et al., 2016; KARVELIS; SIKSNYS, 2022; KARVELIS; GASIUNAS; SIKSNYS, 2017).

Imagen 17 – Diferentes formas de hallar variantes mejoradas de las proteínas Cas.



Fuente: Adaptado de KARVELIS; SIKSNYS, 2022.

Nota: Los principales enfoques experimentales utilizados para ampliar el conjunto de herramientas basadas en Cas9 pueden agruparse en diseño racional guiado por estructuras, evolución dirigida y búsqueda de nuevos ortólogos de Cas9. Tanto la mutagénesis guiada por estructura como la evolución dirigida, combinadas con diversas estrategias de selección, han generado variantes de Cas9 con mayor especificidad y reconocimiento PAM modificado. Además, el análisis bioinformático de bases de datos seguido de la validación experimental ha permitido identificar nuevas proteínas Cas9 con diferencias en

tamaño, especificidad y requisitos de secuencia PAM.

Estas técnicas de expansión de variantes también fue utilizada en otros sistemas CRISPR, como por ejemplo el del tipo V, donde fue hallada la variante Cas12e también denominada CasX, que presenta un tamaño reducido en relación a otras del mismo tipo y con requerimientos PAM diferentes. Otra variante es Cas12f que fue modificada por ingeniería para generar un homólogo con actividad nucleasa rediseñada (o con función inactiva: dCas12) que funcione más eficientemente en células de mamíferos (CasMINI) (LIU et al., 2019; LIAO et al., 2025).

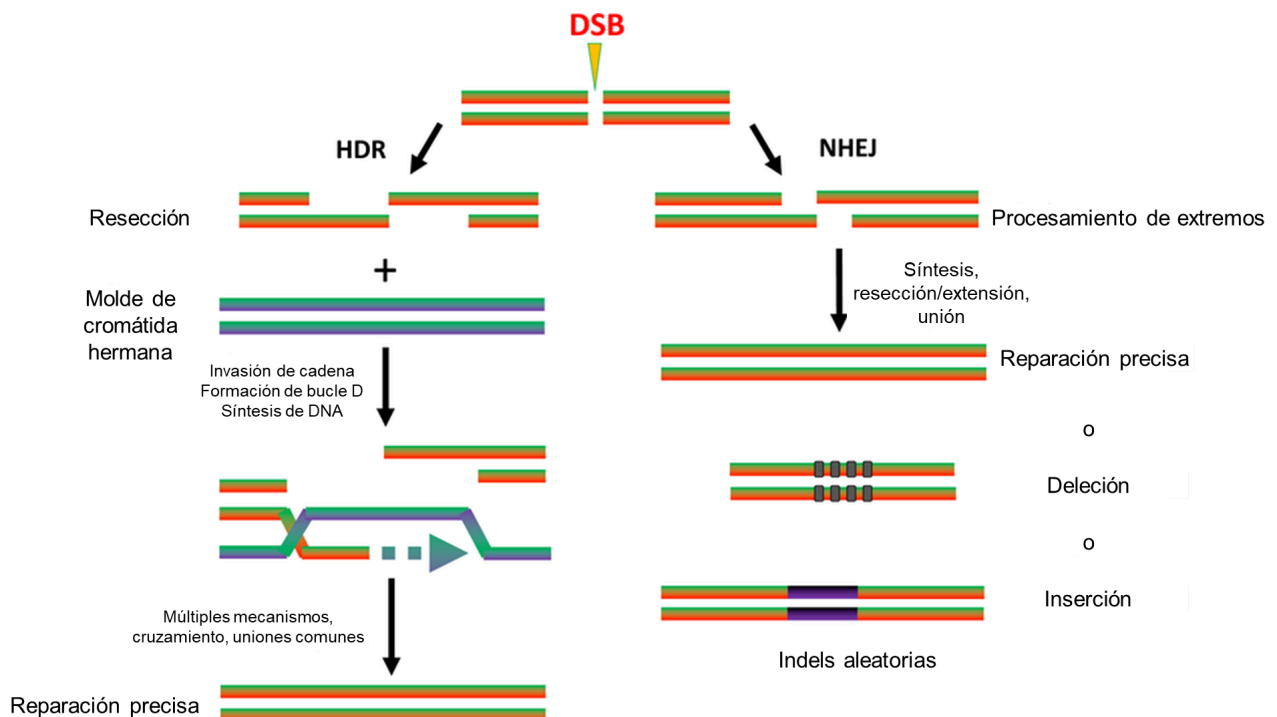
2.6 APLICACIONES EMERGENTES

Muchas de las aplicaciones de los sistemas CRISPR involucran el uso de la Cas9 debido a la capacidad de programado para dirigirse a prácticamente cualquier secuencia de DNA mediante el uso de un RNA guía (gRNA), que deriva de la fusión del tracrRNA y crRNA encontrados en el sistema de defensa CRISPR-Cas9, denominado sgRNA (del inglés *single-guided RNA*, RNA de guía simple). Este sistema puede ser adaptado para células eucariotas otorgando una plataforma de reconocimiento precisa, flexible, y escalable para la edición genética y regulación de la expresión génica, que abre el camino a aplicaciones terapéuticas. La producción de una Cas9 con actividad catalítica inactiva (dCas9) genera cambios metabólicos sin la necesidad de manipular el DNA (LOTFY; HSU, 2022).

La edición genética generada a partir de DSBs inducidas por CRISPR-Cas9 aprovecha de la maquinaria de reparación endógena para inducir un *knockout* o *knock-in* génico. Tal como se indicó previamente, la reparación del DNA mediante la vía de unión de extremos no homólogos (NHEJ) depende de proteínas accesorias, incluidas polimerasas y nucleasas, que procesan los extremos del DNA cuando no son directamente ligables, promoviendo la formación de microhomologías que permiten la ligación de cadenas no homólogas (Imagen 18). Estas proteínas accesorias pueden generar inserciones o deleciones (indels) en las regiones terminales de la molécula de DNA, que al ser introducidos en regiones génicas (típicamente correspondientes al N terminal de la proteína) pueden generar codones de término prematuros que sin la función original. La utilización de predicciones bioinformáticas de secuencias probables de generación de indels permite diseñar los sgRNA a partir de estas secuencias, permitiendo la promoción de estos codones de término. En relación al

knock-in génico, este es producido por la reparación por recombinación homóloga (HDR), en la que luego del DSB se procesan los extremos generando extremos salientes 3', que son estabilizados por proteínas RPA (Imagen 18). El reclutamiento posterior de BRCA1 y BRCA2 promueve la invasión de cadena de los extremos procesados hacia un dsDNA con secuencias homólogas, el cual actúa como molde donador durante el proceso de recombinación homóloga. Este molde puede ser colocado de forma exógena, y en el cual se encuentra un transgén que luego será insertado en el genoma en reparación. La generación de DSBs presenta una relativamente alta toxicidad, lo que permitió el desarrollo de estrategias dependientes de roturas de cadena simple por la actividad de nickasas (como Cas9n). Estas roturas son tratadas mediante la reparación por escisión de bases o por HDR, pero son menos eficientes que las reparaciones a partir de DSBs. Otra estrategia de edición es mediante la modificación química de las bases nitrogenadas, que permite mutaciones puntuales de un único nucleótido. Estos modificadores se pueden encontrar fusionados a dCas (como fue mencionado anteriormente) (YANG et al., 2020).

Imagen 18 – Mecanismos de reparación por recombinación homóloga (HDR) y unión de extremos no homólogos (NHEJ).



Fuente: Adaptado de ALLEMAILEM et al., 2022.

Nota: Esquema comparativo de las dos principales vías celulares de reparación de roturas de doble cadena (DSB) en el DNA: reparación dirigida por homología (HDR) y unión de extremos no homólogos (NHEJ). En la rama izquierda, la vía HDR inicia con el procesamiento de los extremos rotos y el uso de un molde

homólogo, generalmente la cromátida hermana. Este proceso incluye invasión de cadena, formación de bucles y síntesis de DNA, culminando en una reparación precisa gracias a mecanismos como recombinación o ligación correcta. En la parte derecha, la vía NHEJ procede mediante el procesamiento y ligación directa de los extremos del DNA, lo que puede resultar en reparación precisa, pero con frecuencia genera indels aleatorios, incluyendo deleciones o inserciones.

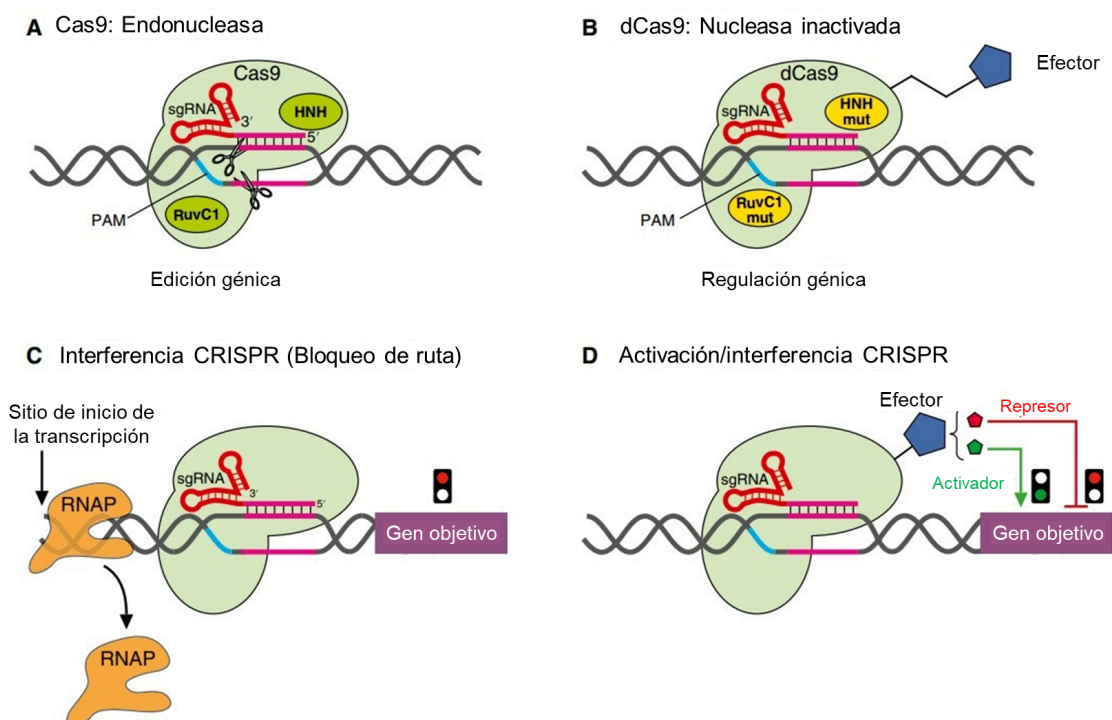
Los estudios genéticos basados en CRISPR-Cas son numerosos. En uno de ellos se empleó el diseño racional de ediciones mediante CRISPR para generar líneas celulares portadoras de distintos alelos vinculados a la enfermedad de Alzheimer. Se conoce que el gen *APOE* codifica un apolipoproteína que puede tener tres variantes (*APOE-ε2*, *-ε3* y *-ε4*), donde la variante *APOE-ε4* es el alelo relacionado al riesgo de desarrollo de la enfermedad. En dicho trabajo fueron generadas líneas homocigotas de *APOE-ε3* y *APOE-ε4*, donde posteriormente se determinaron las diferencias metabólicas y estructurales. Se observó que en *APOE-ε4* presenta una acumulación de colesterol, maduración celular temprana y ingesta disminuida de amiloide beta, características que se desarrollan con la degeneración neuronal. La edición genética también permite crear animales transgénicos de manera más simple, evitando la utilización de blastocistos y hembras preñadas por varias generaciones para la obtención de líneas transgénicas puras. Con CRISPR este proceso complejo puede realizarse en un paso sin la utilización de intermediarios, evitando además la formación de organismos con mosaicos genómicos. Otro uso de CRISPR consiste en la rápida dispersión de un gen en una población mediante el uso de sistemas de impulsores genéticos. Estos consisten en agrupaciones genéticas de Cas9, sgRNA dirigido a un alelo natural y una región homóloga adyacente con un alelo modificado. La inserción de este sistema en un genoma permite que ocurra una duplicación del alelo modificado por recombinación homóloga. De este modo, la reproducción de un organismo modificado con otro no editado permite que la copia del grupo génico pase a toda la progenie a una tasa mucho mayor a la normal (LOTFY; HSU, 2022).

La edición genética por CRISPR también puede ser utilizada en la terapia génica. La delección de genes deletéreos como los genes mutados encontrados en la β-talasemia permite aumentar la calidad de vida de pacientes con esta enfermedad. Mediante la eliminación de un activador genético, se puede disminuir la producción del gen mutado HHB, que naturalmente inhibe al gen HbF (otro tipo de hemoglobina relacionada al desarrollo fetal). Esta represión induce a la producción de HbF que mejora los resultados clínicos, y mediante la edición genética de células madre hematopoyéticas

se logra un resultado a largo plazo (PSATHA et al., 2018). Otra aplicación en la terapia génica es la inserción de receptores de antígenos quiméricos en células inmunológicas T, que permiten aumentar la respuesta antitumoral y la programación específica a células cancerosas. Esta estrategia anteriormente utilizaba la edición por virus integradores que podían provocar resultados impredecibles por la integración aleatoria de secuencias en el genoma. La maquinaria CRISPR y su alta especificidad permiten que esas inserciones sean controladas, permitiendo el desarrollo de metodologías más seguras (Imagen 19 A) (LOTFY; HSU, 2022).

La modulación génica causada por dCas9 puede ser causada por el bloqueo estérico de la RNA polimerasa (interfiriendo en la iniciación o elongación transcripcional) o por impedir la unión de factores de transcripción (Imagen 19 B). El conjunto de técnicas derivadas del uso de CRISPR para reprimir la expresión génica se denomina interferencia por CRISPR (CRISPRi) (Imagen 19 C y D). Esta represión puede dirigirse simultáneamente a muchos genes mediante la utilización de sgRNA diferentes, lo que permite la evaluación de la función génica en conjunto. Sin embargo esta metodología de bloqueo no es muy eficiente en células eucariotas (hasta el 80% de eficiencia inhibitoria), por lo que adaptaciones en el mecanismo de interferencia fueron necesarias. Una de esas modificaciones (denominada CRISPRd) permite obtener resultados de alta resolución en células de mamíferos, la cual se logra mediante el bloque de factores de transcripción específicos (NOORDERMEER; CHEN; QI, 2022).

Imagen 19 – Aplicaciones de Cas9 en el contexto de la edición y regulación génica.

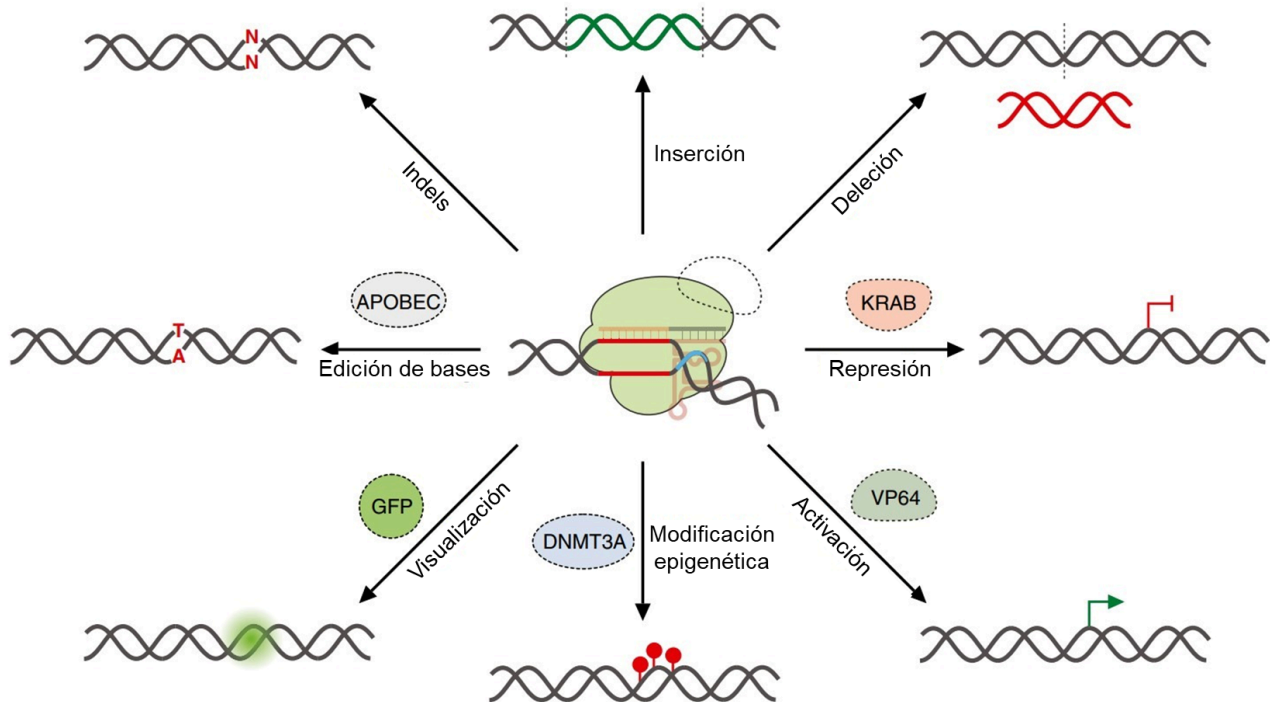


Fuente: Adaptado de NOORDERMEER; CHEN; QI, 2022.

Nota: A) Se muestra cómo la nucleasa Cas9 reconoce secuencias específicas mediante el apareamiento directo de la sgRNA con el DNA objetivo, proceso guiado por la presencia de un motivo PAM en el extremo 5'. Una vez unido, Cas9 escinde la doble hebra utilizando sus dos dominios nucleasa. B) En contraste, la proteína dSpyCas9 carece de actividad nucleasa debido a mutaciones en los dominios RuvC1. No obstante, mantiene la capacidad de dirigirse a secuencias específicas gracias a la sgRNA y al PAM, permitiendo su uso como plataforma para modular la transcripción al acoplarse con efectores reguladores. C) La unión de dCas9 al DNA puede bloquear físicamente el avance de la RNA polimerasa, inhibiendo la elongación transcripcional y suprimiendo la expresión génica en un mecanismo conocido como CRISPRi. D) Enfoques de CRISPRi/a con la fusión de dCas9 con activadores o represores transcripcionales que permiten modular la expresión de genes objetivo, ya sea activándolos o reprimiéndolos.

La fusión de dCas9 a activadores o represores de la transcripción es otro enfoque más eficiente para lograr una represión más aguda (Imagen 19 D). La utilización de dominios como KRAB (del inglés *Kruppel-associated box*, dominio asociado a Kruppel) permiten la disminución de la expresión génica en más del 90%. Este dominio pertenece a una familia de represores transcripcionales que recluta otros correpresores y modificadores epigenéticos que por ejemplo permiten la restricción del acceso transcripcional por modulación de la cromatina. Estas regulaciones demostraron ser dependientes de la ubicación de la unión del sgRNA a su objetivo, siendo obtenidos mejores resultados en la zona de 50 a 100 pares de bases corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción. Del mismo modo que CRISPRi, la fusión de activadores transcripcionales a dCas9 permite el aumento de la actividad génica (CRISPRa). Dominios que presentan esta función son la proteína viral del herpes simplex VP16 o copias de esta en tándem (VP64). La eficiencia del aumento de la activación transcripcional genera niveles de expresión de 2 a 5 veces mayor. Ejemplos de ensayos diseñados con estos componentes son SunTag, SpyTag y la metodología VPR, los cuales utilizan diferentes activadores. Otra estrategia de modulación es la utilización de aptámeros de RNA fusionados al sgRNA, que permiten la ligación de los factores activadores. La metodología SAM utiliza esta técnica, y consiguen eficiencias de expresión de 100 a 1000 veces mayores (NOORDERMEER; CHEN; QI, 2022).

Imagen 20 – Aplicaciones de dCas.



Fuente: Adaptado de NOORDERMEER; CHEN; QI, 2022.

Nota: Aplicaciones derivadas del complejo ribonucleoproteico de Cas9 y sus variantes. Cas9 catalíticamente activa puede generar rupturas de doble cadena (DSB) en el DNA cromosómico, las cuales, al ser reparadas mediante la vía de unión de extremos no homólogos (NHEJ), producen inserciones o deleciones que conducen a la inactivación génica. Si la reparación ocurre a través de la recombinación dirigida por homología (HDR), que requiere un molde de DNA homólogo, es posible realizar ediciones precisas como reemplazos génicos, inserciones definidas o mutaciones específicas. Además, la variante catalíticamente inactiva dCas9 puede fusionarse con dominios efectores para activar o reprimir genes, realizar modificaciones epigenéticas, visualizar secuencias en células vivas y otras funciones regulatorias. Por otra parte, el uso de dCas9 o Cas9n (nickasa) unidas a desaminasas como AID, APOBEC o a versiones modificadas de TadA permite la edición de bases, facilitando conversiones dirigidas de C a T o de A a G con gran precisión.

La utilización de sistemas inducibles y reversibles de modificación de la expresión génica permite que mediante el uso de segundos mensajeros o señales inductoras se produzcan cambios en la transcripción (Imagen 20). Por ejemplo la fusión de dCas9 a receptores epigenéticos permite que en presencia de luz con cierta longitud de onda específica se active un mecanismo de dimerización de dominios ligados a dCas9. También la señal puede inducir la dimerización de mitades de Cas9 inicialmente separadas, dando así inicio a la activación de su función. Ejemplos de señales inductoras son la luz azul y la rapamicina. La utilización de biosensores de RNA también es otra

estrategia sensible a señales inductoras, en donde la utilización de aptámeros de RNA liberan el sitio de unión del sgRNA mediante la presencia de una molécula o condición inductora. Un ejemplo de estos sistemas es el uso de *riboswitches* que inicialmente se encuentran asociados al sgRNA por complementariedad de bases. Tras la unión a una molécula señalizadora, se disocian y experimentan un cambio conformacional que provoca la separación del complejo (STALLONE et al., 2014; NOORDERMEER; CHEN; QI, 2022).

Otra estrategia es la modificación química del DNA o de histonas para provocar cambios en la cromatina que influyan en la expresión genética, como se observa en la Imagen 20. Es sabido que la metilación del DNA genera represión génica por impedir la ligación de la RNA polimerasa. Del mismo modo la modificación de histonas mediante metilaciones o acetilaciones disminuye o aumenta la expresión génica. La fusión de dCas9 y metilasas o desmetilasas permiten regular la actividad de la RNA polimerasa mediante la alteración del patrón de metilación del DNA, lo que lleva a silenciamientos génicos prolongados. La alteración química de histonas mediante dominios de modificación química también puede provocar cambios en los niveles de expresión génica (NOORDERMEER; CHEN; QI, 2022).

La combinación de estos mecanismos epigenéticos podrían ser útiles en la reprogramación celular, por ejemplo en el desarrollo de células pluripotentes, además de utilizarse como forma de tratamiento frente a enfermedades genéticas raras como diabetes tipo 1 y la distrofia muscular de Duchenne. La utilización de la variante de Cas9 derivada de *Staphylococcus aureus* presenta un menor tamaño estructural, lo que permite que pueda ser empaquetada en vesículas adenovirales, junto con los componentes necesarios para su funcionamiento (LI et al., 2023).

La edición del genoma mediante CRISPR-Cas está revolucionando la agricultura al permitir modificaciones genéticas precisas, eficientes y de bajo costo en los cultivos, acelerando el desarrollo de variedades más resilientes, productivas y nutritivas. Esta tecnología se aplica para generar resistencia a enfermedades y plagas mediante la eliminación de genes de susceptibilidad o la introducción de genes de resistencia, como en el arroz resistente al tizón bacteriano o el trigo resistente al oídio. También mejora la tolerancia a estreses abióticos (sequía, salinidad, calor, frío y otros factores ambientales) contribuyendo a la productividad en el contexto del cambio climático. CRISPR permite además optimizar el rendimiento y la calidad al modificar genes que controlan el tamaño del grano, la vida útil, el sabor y la composición nutricional, incluyendo la biofortificación

para aumentar vitaminas o proteínas en cultivos básicos. La edición de genes específicos puede conferir resistencia a herbicidas para facilitar el control de malezas, y los métodos de entrega libres de DNA permiten obtener cultivos editados sin transgenes, lo que podría simplificar los procesos regulatorios y mejorar la aceptación pública. Con esto, CRISPR impulsa la domesticación acelerada de especies silvestres, posibilitando la modificación simultánea de varios genes y acortando significativamente los ciclos de mejoramiento (CHEN et al., 2024; BHANU, 2024).

La bioseguridad y el biocontención en CRISPR son esenciales para el uso responsable de organismos modificados, especialmente en ambientes abiertos o aplicaciones terapéuticas, y los avances recientes se centran en *kill-switches* robustos (interruptores de muerte celular bajo condiciones específicas) y en el control preciso de transgenes para evitar proliferación o transferencia genética no deseada. Los *kill-switches* basados en CRISPR emplean nucleasas programables, como Cas9, para inducir la muerte celular en condiciones no permisivas mediante señales ambientales o inductores químicos, aunque enfrentan desafíos de estabilidad debido a la presión evolutiva que genera mutantes que escapen a estos mecanismos (ROTTINGHAUS et al., 2022). Por ello, se desarrollan estrategias como la redundancia de circuitos, el direccionamiento a múltiples loci genómicos y la combinación con métodos adicionales de contención como la auxotrofia, considerando además que su eficacia puede disminuir en condiciones ambientales reales, lo que exige pruebas específicas según el contexto. En cuanto al control de transgenes y vigilancia genética, se han diseñado circuitos capaces de eliminar transgenes sin matar a la célula, reduciendo costos de aptitud y la aparición de organismos evasivos, mientras que otros sistemas previenen la transferencia horizontal de genes mediante la degradación de elementos genéticos transferidos (HAYASHI et al., 2024). Finalmente, los interruptores químicos y proteicos, incluyendo moléculas que actúan como “interruptores de apagado” y las proteínas anti-CRISPR, proporcionan un control reversible y modulable de la actividad CRISPR, añadiendo una capa adicional de seguridad para aplicaciones terapéuticas e industriales (DOLGIN, 2020; ALLEMAILEM et al., 2024).

Cuadro 2 – Resumen de aplicaciones biotecnológicas de los tipos de sistemas CRISPR.

Tipo	Aplicación	Referencia
Tipo I	Edición genética Contraselección Regulación transcripcional	BROUNS; VAN DER OOST, 2023 JIANG et al., 2013 LUO et al., 2015 YOUNG et al., 2019
Tipo II	Edición genética Regulación transcripcional Visualización molecular Modificaciones epigenéticas	ANZALONE et al, 2019 HSU; LANDER; ZHANG, 2014 GILBERT et al, 2013 CHEN et al, 2013 HILTON et al, 2015
Tipo III	Defensa antiviral Diagnóstico Detección de ácidos nucleicos	CHOU-ZHEN; HATOUM-ASLAN, 2019 STEENS et al, 2021 SRIDHARA et al, 2021 SANTIAGO-FRANGOS et al., 2021
Tipo IV	Control de resistencia microbiana	BENZ et al., 2024
Tipo V	Detección de ácidos nucleicos	HILLARY; CEASAR, 2023 KWAK; PARK; SONG, 2023
Tipo VI	Regulación de la expresión génica Terapia contra el cáncer Detección de ácidos nucleicos Edición genética Visualización de RNA	KONERMANN et al, 2018 ZHAO et al, 2018 GOOTENBERG et al, 2018 ABUDAYYEH et al, 2019 COX et al, 2017 CHEN et al, 2019

2.7. DESAFÍOS Y PERSPECTIVAS FUTURAS

Las metodologías derivadas de la dirección programada de Cas9 requieren de una especificidad elevada para la aplicación en diversas áreas como la clínica. La sobreactivación de un gen no objetivo puede resultar en la expresión de

oncogenes y otros problemas metabólicos. En relación a dCas9 existen resultados contrapuestos en relación a la unión no específica a secuencias, en los cuales se muestran una baja o alta ocupación de sitios no objetivo. También fue observado que la utilización de metilasas fusionadas a dCas9 pueden generar estados de hipermetilación no específicos, pero que no se correlacionaron con los sitios no objetivo de dCas9, indicando que la especificidad de ligación de Cas9 no es el único factor que influye en la proporción de unión específica-no específica (NOORDERMEER; CHEN; QI, 2022).

Otra limitación importante es el potencial de que los componentes de CRISPR desencadenan respuestas inmunitarias, lo sigue siendo una barrera significativa para el uso clínico seguro y eficaz de las tecnologías CRISPR. Un aspecto clave es la inmunidad preexistente. Muchos individuos poseen anticuerpos y respuestas de células T contra proteínas Cas9 ampliamente utilizadas, como SpCas9 o SaCas9, ya que provienen de bacterias comunes a las que las personas están expuestas con frecuencia. Esto puede provocar una rápida eliminación de los componentes de CRISPR o desencadenar reacciones adversas al administrarlos. Tanto el sistema inmunitario innato (que detecta ácidos nucleicos o proteínas extrañas) como el adaptativo (responsable de la producción de anticuerpos y células T citotóxicas) pueden activarse durante la entrega *in vivo*, reduciendo la eficacia del tratamiento e incluso destruyendo células editadas (UDDIN; RUDIN; SEN, 2020).

Estas respuestas inmunitarias pueden afectar negativamente la terapia, disminuyendo la eficiencia de edición genética, provocando inflamación o eliminando las células modificadas. Como consecuencia, los resultados terapéuticos se ven comprometidos y aumenta el riesgo de efectos secundarios, lo que dificulta la aplicación clínica segura de CRISPR (ALLEMAILEM et al., 2023).

Para mitigar estos problemas se han propuesto diversas estrategias. La ingeniería de proteínas permite modificar Cas9 para eliminar o enmascarar epítomos inmunogénicos, reduciendo su reconocimiento por el sistema inmune sin afectar su actividad. Otra opción es utilizar ortólogos alternativos, como CjCas9, que podrían evadir la inmunidad preexistente. Sin embargo, estas enzimas están menos estudiadas y podrían presentar riesgos aún desconocidos. También se investigan innovaciones en los sistemas de entrega, como nanopartículas lipídicas o transportadores sintéticos, así como la administración transitoria de complejos ribonucleoproteicos, que exponen al sistema inmune durante menos tiempo y disminuyen la probabilidad de respuesta inmunitaria (UDDIN; RUDIN; SEN, 2020). Finalmente, en algunos casos puede recurrirse a

regímenes temporales de inmunosupresión para reducir las respuestas inmunes durante el tratamiento. No obstante, esta opción aumenta el riesgo de infecciones y no es adecuada para todos los pacientes, por lo que se considera una medida complementaria pero no ideal para una aplicación clínica generalizada (WILBIE; WALTHER; MASTROBATTISTA, 2019).

Los avances recientes en CRISPR abarcan el descubrimiento de nuevos sistemas, la integración de inteligencia artificial y los progresos en bioinformática estructural, ampliando las capacidades y la precisión de esta tecnología. La exploración continua de la diversidad microbiana sigue revelando sistemas CRISPR-Cas y efectores novedosos, lo que ha dado lugar al concepto de “meta-CRISPR”, que es la búsqueda de datos metagenómicos para identificar sistemas previamente desconocidos con propiedades únicas, como especificidades de objetivos distintas o perfiles de entrega mejorados, que expanden y hacen más versátil la edición genómica. Paralelamente, la inteligencia artificial está transformando el diseño y la aplicación de CRISPR al optimizar el diseño de RNA guía, predecir efectos fuera de objetivo y facilitar el descubrimiento y la ingeniería de nuevas proteínas Cas. Herramientas como los modelos de aprendizaje automático y predictores estructurales (incluidos los derivados de AlphaFold) permiten mejorar la eficiencia, reducir errores y diseñar editores más compactos y eficaces. Finalmente, los avances en bioinformática estructural, como los modelos basados en grafos que integran información de secuencia y estructura secundaria, están refinando la comprensión de los mecanismos de las proteínas CRISPR-Cas y favoreciendo el diseño racional de variantes con propiedades adaptadas a múltiples aplicaciones biomédicas y biotecnológicas (KIM et al., 2025; ZHANG, 2019).

El rápido avance de la edición genómica mediante CRISPR ha generado complejos debates éticos, regulatorios y de acceso, especialmente en relación con la modificación de la línea germinal humana, las patentes y la distribución equitativa de la tecnología. La edición de la línea germinal (que consiste en la alteración de genes en óvulos, espermatozoides o embriones) plantea profundas preocupaciones éticas, como por ejemplo el riesgo de cambios genéticos no deseados, las dificultades para obtener un consentimiento informado de generaciones futuras y los temores relacionados con la eugenesia o los “bebés de diseño”. Muchos científicos y especialistas en ética coinciden en que, aunque CRISPR debería emplearse para el modelado de enfermedades y la investigación, su uso con fines de mejora humana o en aplicaciones no terapéuticas es ampliamente rechazado. El potencial de efectos fuera de objetivo heredables y la

incapacidad de las generaciones futuras para otorgar consentimiento representan dilemas éticos centrales. También existe preocupación de que el acceso desigual a estas tecnologías pueda agravar las desigualdades sociales (AYANOĞLU; ELÇIN; ELÇIN, 2020).

La regulación de la edición de la línea germinal varía en todo el mundo. Algunos países tienen prohibiciones estrictas (por ejemplo, el Reino Unido), otros poseen restricciones ambiguas o basadas en directrices (como Japón o China), y organismos internacionales como la UNESCO desaconsejan la edición germinal. La falta de directrices internacionales armonizadas genera un mosaico de regulaciones que complica la supervisión y la aplicación. Casos recientes y de alto perfil, como el de los “bebés CRISPR” en China, han impulsado reformas regulatorias, pero también han puesto de manifiesto la persistente brecha entre los avances tecnológicos y los marcos legales. Las demandas por regulaciones sólidas, flexibles y basadas en la precaución, así como por una participación pública continua, son generalizadas (WANG; SHANG; ZHANG, 2023).

El panorama de las patentes de CRISPR está altamente disputado, con instituciones importantes (como el Broad Institute y la Universidad de California en Berkeley) que poseen patentes fundamentales e imponen restricciones de licencia en usos controvertidos, como la edición de la línea germinal humana o los impulsores génicos. Los titulares de patentes pueden limitar o guiar el uso de la tecnología mediante los términos de licencia, pero esta gobernanza privada no siempre se alinea con los intereses públicos ni con la supervisión democrática (MATTHEWS, 2020). Existen preocupaciones de que la patentación pueda restringir el acceso, aumentar los costos y limitar los beneficios de la tecnología a individuos o países más ricos, lo que plantea problemas de justicia social y derechos humanos. Algunos abogan por modelos de gobernanza mixtos y licencias obligatorias para equilibrar los incentivos a la innovación con el bien público. La promesa de CRISPR va acompañada de desafíos éticos, regulatorios y de acceso. Abordarlos requiere un diálogo global, una regulación adaptable y un equilibrio cuidadoso entre innovación, equidad e interés público (FEENEY et al., 2018).

3 CONSIDERACIONES FINALES

La intuición y capacidad de creación humana parecen no presentar ningún tipo de barrera que impida su avance hacia el descubrimiento de nuevas tecnologías que permitan mejorar el mundo actual. En este trabajo se resaltaron algunas de las actividades y trabajos derivados del descubrimiento de los sistemas CRISPR, desde 1987, además de su clasificación y estructura de cada módulo de acción. Es importante mencionar que la cooperación científica es lo que permite mayor eficacia en el manejo de los nuevos datos adquiridos, de modo a obtener resultados de forma más rápida y precisa. El trabajo conjunto de diversas áreas del conocimiento científico (como biología celular, microbiología, biología molecular e ingeniería genética) permitió que el estudio de un mecanismo de defensa procariota impulsara el desarrollo de técnicas de ingeniería genética y molecular tan avanzadas que establecieron nuevos paradigmas experimentales. Asimismo, estas técnicas dieron lugar a innovadoras estrategias de diagnóstico y tratamiento con sensibilidades sobresalientes.

La constante mejora en el diseño de las herramientas derivadas de sistemas CRISPR permite el constante perfeccionamiento de estas, que naturalmente pueden no presentar las características óptimas de trabajo. Así es como la obtención de librerías creadas a partir de la diversidad de sistemas CRISPR permite adaptar cada componente al objetivo particular de cada aplicación. En este sentido la introducción de tecnologías modernas como la inteligencia artificial y programas de bioinformática ayudan a manejo eficiente de la nueva información que se genera a cada instante, enfocando los esfuerzos de trabajo en los problemas como la actividad fuera del objetivo, la inmunogenicidad y el transporte a los tejidos deseados. Además, el estudio de nuevos sistemas CRISPR permite conocer el proceso evolutivo del mecanismo de defensa, permitiendo realizar asociaciones entre organismos de manera genética y metabólica. De estos descubrimientos recientes pueden producirse nuevas tecnologías complementarias a las actuales o que inclusive las desplacen, permitiendo la mejora de técnicas que aumenten en su conjunto la calidad de vida de las personas.

REFERENCIAS

ABUDAYYEH, O. O.; GOOTENBERG, J. S. CRISPR-Cas13: biology, mechanism, and applications of RNA-guided, RNA-targeting CRISPR systems. In: BARRANGOU, R.; VAN DER OOST, J. (Ed.). CRISPR-Cas: functional and applied aspects. Washington: ASM Press, 2022. p. 99-120. ISBN 9781683670377. DOI: 10.1002/9781683673798.ch7. Disponible en: <https://doi.org/10.1002/9781683673798.ch7>.

ABUDAYYEH, O. O. et al. A cytosine deaminase for programmable single-base RNA editing. *Science*, v. 365, p. 382-386, 2019. Disponible en: <https://doi.org/10.1126/science.aax7063>.

ALLEMAILEM, K. S.; ALSAHLI, M. A.; ALMATROUDI, A.; ALRUMAIHI, F. A.; AL ABDULMONEM, W.; MOAWAD, A. A.; ALWANIAN, W. M.; ALMANSOUR, N. M.; RAHMANI, A. H.; KHAN, A. A. Innovative strategies of reprogramming immune system cells by targeting CRISPR/Cas9-based genome-editing tools: a new era of cancer management. *International Journal of Nanomedicine*, v. 18, p. 5531-5559, 2023. DOI: 10.2147/ijn.s424872. Disponible en: <https://doi.org/10.2147/ijn.s424872>.

ALLEMAILEM, K. S.; ALSAHLI, M. A.; ALMATROUDI, A.; ALRUMAIHI, F. A.; ALKHALEEF, F. K.; RAHMANI, A. H.; KHAN, A. A. Current updates of CRISPR/Cas9-mediated genome editing and targeting within tumor cells: an innovative strategy of cancer management. *Cancer Communications*, v. 42, n. 12, p. 1257-1282, 2022. DOI: 10.1002/cac2.12366. Disponible en: <https://doi.org/10.1002/cac2.12366>.

ALLEMAILEM, K. S.; ALMATROUDI, A.; RAHMANI, A. H.; ALRUMAIHI, F. A.; ALRADHI, A. E.; ALSUBAIYEL, A.; ALGAHTANI, M.; ALMOUSA, R.; MAHZARI, A.; SINDI, A. A.; DOBIE, G.; KHAN, A. A. Recent updates of the CRISPR/Cas9 genome editing system: novel approaches to regulate its spatiotemporal control by genetic and physicochemical strategies. *International Journal of Nanomedicine*, v. 19, p. 5335-5363, 2024. DOI: 10.2147/ijn.s455574. Disponible en: <https://doi.org/10.2147/ijn.s455574>.

ANZALONE, A. V.; RANDOLPH, P. B.; DAVIS, J. R.; SOUSA, A. A.; KOBLAN, L. W.; LEVY, J. M.; CHEN, P. J.; WILSON, C.; NEWBY, G. A.; RAGURAM, A.; LIU, D. R. Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. *Nature*, v. 576, n. 7785, p. 149-157, 2019. DOI: 10.1038/s41586-019-1711-4. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1711-4>.

AYANOĞLU, F. B.; ELÇİN, A. E.; ELÇİN, Y. M. Bioethical issues in genome editing by CRISPR-Cas9 technology. *Turkish Journal of Biology*, v. 44, n. 2, p. 110-120, 2020. DOI: 10.3906/biy-1912-52. Disponible en: <https://doi.org/10.3906/biy-1912-52>.

BHANU, L. S. M. Clustered regularly interspaced short palindromic repeats-Cas: a potential genome editing tool in crop improvement. In: THE 3RD INTERNATIONAL ELECTRONIC CONFERENCE ON AGRONOMY, 2023. Proceedings... Basel: MDPI, 2024. DOI: 10.3390/iecag2023-15873. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/iecag2023-15873>.

BARRANGOU, R.; FREMAUX, C.; DEVEAU, H.; RICHARDS, M.; BOYAVAL, P.; MOINEAU, S.; ROMERO, D. A.; HORVATH, P. CRISPR provides acquired resistance

against viruses in prokaryotes. *Science*, v. 315, n. 5819, p. 1709-1712, 2007. DOI: 10.1126/science.1138140. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/science.1138140>.

BARRANGOU, R.; MARRAFFINI, L. A.; SONTHEIMER, E. J. CRISPR-Cas systems: core features and common mechanisms. In: BARRANGOU, R.; VAN DER OOST, J. (Ed.). *CRISPR-Cas: functional and applied aspects*. Washington: ASM Press, 2022. p. 1-12. ISBN 9781683670377. DOI: 10.1002/9781683673798.ch1. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/9781683673798.ch1>.

BECKETT, M. Q.; RAMACHANDRAN, A.; BAILEY, S. Type V CRISPR-Cas systems. In: BARRANGOU, R.; VAN DER OOST, J. (Ed.). *CRISPR-Cas: functional and applied aspects*. Washington: ASM Press, 2022. p. 85-97. ISBN 9781683670377. DOI: 10.1002/9781683673798.ch6. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/9781683673798.ch6>.

BENZ, F.; CAMARA-WILPERT, S.; RUSSEL, J.; WANDERA, K.; ČEPAITÉ, R.; ARES-ARROYO, M.; GOMES-FILHO, J.; ENGLERT, F.; KUEHN, J.; GLOOR, S.; MESTRE, M.; CUÉNOD, A.; AGUILÀ-SANS, M.; MACCARIO, L.; EGLI, A.; RANDAU, L.; PAUSCH, P.; ROCHA, E.; BEISEL, C.; MADSEN, J.; BIKARD, D.; HALL, A.; SØRENSEN, S.; PINILLA-REDONDO, R. Type IV-A3 CRISPR-Cas systems drive inter-plasmid conflicts by acquiring spacers in trans. *Cell Host & Microbe*, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chom.2024.04.016>.

BETTS, H. C.; PUTTICK, M. N.; CLARK, J. W.; WILLIAMS, T. A.; DONOGHUE, P. C. J.; PISANI, D. Integrated genomic and fossil evidence illuminates life's early evolution and eukaryote origins. *Nature Ecology & Evolution*, v. 2, n. 10, p. 1556-1562, 2018. DOI: 10.1038/s41559-018-0644-x. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41559-018-0644-x>.

BHATIA, S.; SHUKLA, P.; YADAV, S. CRISPR-Cas for genome editing: classification, mechanism, designing and applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 236, p. 124054, 2023. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2023.124054. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.124054>.

BOLOTIN, A.; QUINQUIS, B.; SOROKIN, A.; EHRLICH, S. D. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology*, v. 151, n. 8, p. 2551-2561, 2005. DOI: 10.1099/mic.0.28048-0. Disponível em: <https://doi.org/10.1099/mic.0.28048-0>.

BROUNS, S. J. J.; JORE, M. M.; LUNDGREN, M.; WESTRA, E. R.; SLIJKHUIS, R. J. H.; SNIJDERS, A. P. L.; DICKMAN, M. J.; MAKAROVA, K. S.; KOONIN, E. V.; VAN DER OOST, J. Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. *Science*, v. 321, n. 5891, p. 960-964, 2008. DOI: 10.1126/science.1159689. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/science.1159689>.

BROUNS, S. J.; VAN DER OOST, J. Modified Cascade ribonucleoproteins and uses thereof. WO2013098244, 4 jul. 2013.

CHEN, F.; CHEN, L.; YAN, Z.; XU, J.; FENG, L.; HE, N.; GUO, M.; ZHAO, J.; CHEN, Z.; CHEN, H.; YAO, G.; LIU, C. Recent advances of CRISPR-based genome editing for enhancing staple crops. *Frontiers in Plant Science*, v. 15, p. 1478398, 2024. DOI: 10.3389/fpls.2024.1478398. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fpls.2024.1478398>

CHEN, B.; GILBERT, L. A.; CIMINI, B. A.; SCHNITZBAUER, J.; ZHANG, W.; LI, G.; PARK,

J.; BLACKBURN, E. H.; WEISSMAN, J. S.; QI, L. S.; HUANG, B. Dynamic Imaging of Genomic Loci in Living Human Cells by an Optimized CRISPR/Cas System. *Cell*, v. 155, n. 7, p. 1479-1491, 19 dez. 2013. ISSN 0092-8674. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.12.001>.

CHEN, J. S.; MA, E.; HARRINGTON, L. B.; DA COSTA, M.; TIAN, X.; PALEFSKY, J. M.; DOUDNA, J. A. CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity. *Science*, v. 360, n. 6387, p. 436-439, 2018. DOI: 10.1126/science.aar6245. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/science.aar6245>.

CHEN, B. et al. Dynamic Imaging of Genomic Loci in Living Human Cells by an Optimized CRISPR/Cas System. *Cell*, v. 155, n. 7, p. 1479-1491, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.12.001>

CHOU-ZHENG, L.; HATOUM-ASLAN, A. A type III-A CRISPR-Cas system employs degradosome nucleases to ensure robust immunity. *eLife*, v. 8, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.7554/elife.45393>.

COOPER, L. A.; STRINGER, A. M.; WADE, J. T. Determining the specificity of Cascade binding, interference, and primed adaptation in vivo in the *Escherichia coli* Type I-E CRISPR-Cas system. *mBio*, v. 9, n. 1, p. e02100-17, 2018. DOI: 10.1128/mbio.02100-17. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/mbio.02100-17>.

COX, D. B. T.; GOOTENBERG, J. S.; ABUDAYYEH, O. O.; FRANKLIN, B.; KELLNER, M. J.; JOUNG, J.; ZHANG, F. RNA editing with CRISPR-Cas13. *Science*, v. 358, n. 6366, p. 1019-1027, 2017. DOI: 10.1126/science.aag0180. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/science.aag0180>.

DENG, L.; GARRETT, R. A.; SHAH, S. A.; PENG, X.; SHE, Q. A novel interference mechanism by a type IIIB CRISPR-Cmr module in *Sulfolobus*. *Molecular Microbiology*, v. 87, n. 5, p. 1088-1099, 2013. DOI: 10.1111/mmi.12152. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/mmi.12152>.

DETURK, E. A visual guide to genome editors. Asimov Press, 2025. DOI: 10.62211/15yw-55jh. Disponível em: <https://doi.org/10.62211/15yw-55jh>.

DEVEAU, H.; BARRANGOU, R.; GRNAEAU, J. E.; LABONTÉ, J.; FREMAUX, C.; BOYAVAL, P.; ROMERO, D. A.; HORVATH, P.; MOINEAU, S. Phage response to CRISPR-encoded resistance in *Streptococcus thermophilus*. *Journal of Bacteriology*, v. 190, n. 4, p. 1390-1400, 2008. DOI: 10.1128/JB.01412-07. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/JB.01412-07>.

DOLGIN, E. The kill-switch for CRISPR that could make gene-editing safer. *Nature*, v. 577, n. 7790, p. 308-310, 2020. DOI: 10.1038/d41586-020-00053-0. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/d41586-020-00053-0>.

ESTRELLA, M. A.; KUO, F. T.; BAILEY, S. RNA-activated DNA cleavage by the Type III-B CRISPR-Cas effector complex. *Genes & Development*, v. 30, n. 4, p. 460-470, 2016. DOI: 10.1101/gad.273722.115. Disponível em: <https://doi.org/10.1101/gad.273722.115>.

FEENEY, O.; COCKBAIN, J.; MORRISON, M.; DIEPENDAELE, L.; VAN ASSCHE, K.; STERCKX, S. Patenting foundational technologies: lessons from CRISPR and other core

biotechnologies. *The American Journal of Bioethics*, v. 18, n. 12, p. 36-48, 2018. DOI: 10.1080/15265161.2018.1531160. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/15265161.2018.1531160>.

GILBERT, L. A.; LARSON, M. H.; MORSUT, L.; LIU, Z.; BRAR, G. A.; TORRES, S. E.; STERN-GINOSSAR, N.; BRANDMAN, O.; WHITEHEAD, E. H.; DOUDNA, J. A.; LIM, W. A.; WEISSMAN, J. S.; QI, L. S. CRISPR-Mediated Modular RNA-Guided Regulation of Transcription in Eukaryotes. *Cell*, v. 154, n. 2, p. 442-451, 2013. ISSN 0092-8674. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.06.044>.

GOOTENBERG, J. S.; ABUDAYYEH, O. O.; KELLNER, M. J.; JOUNG, J.; COLLINS, J. J.; ZHANG, F. Multiplexed and portable nucleic acid detection platform with Cas13, Cas12a, and Csm6. *Science*, v. 360, n. 6387, p. 439-444, 2018. DOI: 10.1126/science.aag0179. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/science.aag0179>.

GRANADOS-RIVERÓN, J. T.; AQUINO-JARQUIN, G. CRISPR-Cas13 precision transcriptome engineering in cancer. *Cancer Research*, v. 78, n. 15, p. 4107-4113, 2018. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-18-0785. Disponível em: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-0785>.

GRNAEAU, J. E.; DUPUIS, M. È.; VILLION, M.; ROMERO, D. A.; BARRANGOU, R.; BOYAVAL, P.; FREMAUX, C.; HORVATH, P.; MAGADÁN, A. H.; MOINEAU, S. The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature*, v. 468, n. 7320, p. 67-71, 2010. DOI: 10.1038/nature09523. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nature09523>.

HAYASHI, N.; LAI, Y.; FUERTE-STONE, J.; MIMEE, M.; LU, T. K. Cas9-assisted biological containment of a genetically engineered human commensal bacterium and genetic elements. *Nature Communications*, v. 15, n. 1, p. 1739, 2024. DOI: 10.1038/s41467-024-45893-w. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41467-024-45893-w>.

HICKMAN, A. B.; DYDA, F. DNA transposition at work. *Chemical Reviews*, v. 116, n. 20, p. 12758-12784, 2016. DOI: 10.1021/acs.chemrev.6b00003. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00003>.

HILLARY, V. E.; CEASAR, S. A. A review on the mechanism and applications of CRISPR/Cas9/Cas12/Cas13/Cas14 proteins utilized for genome engineering. *Molecular Biotechnology*, v. 65, n. 3, p. 311-325, 2023. DOI: 10.1007/s12033-022-00567-0. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12033-022-00567-0>.

HILLE, F.; RICHTER, H.; WONG, S. P.; BRATOVIČ, M.; RESSEL, S.; CHARPENTIER, E. The biology of CRISPR-Cas: backward and forward. *Cell*, v. 172, n. 6, p. 1239-1259, 2018. DOI: 10.1016/j.cell.2017.11.032.

HILTON, I.; D'IPPOLITO, A.; VOCKLEY, C. et al. Epigenome editing by a CRISPR-Cas9-based acetyltransferase activates genes from promoters and enhancers. *Nature Biotechnology*, v. 33, p. 510-517, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nbt.3199>.

HSU, P. D.; LANDER, E. S.; ZHANG, F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell*, v. 157, n. 6, p. 1262-1278, 2014. DOI:

10.1016/j.cell.2014.05.010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.05.010>.

HWANG, S.; MAXWELL, K. L. Meet the anti-CRISPRs: widespread protein inhibitors of CRISPR-Cas systems. *The CRISPR Journal*, v. 2, n. 1, p. 23-30, 2019. DOI: 10.1089/crispr.2018.0052. Disponível em: <https://doi.org/10.1089/crispr.2018.0052>.

ICHIKAWA, H. T.; COOPER, J. C.; LO, L.; POTTER, J.; TERNS, R. M.; TERNS, M. P. Programmable type III-A CRISPR-Cas DNA targeting modules. *PLoS ONE*, v. 12, n. 4, p. e0176221, 2017. DOI: 10.1371/journal.pone.0176221. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176221>

ISHINO, Y.; KRUPOVIC, M.; FORTERRE, P. History of CRISPR-Cas from Encounter with a Mysterious Repeated Sequence to Genome Editing Technology. *Journal of Bacteriology*, v. 200, 2018. DOI: 10.1128/jb.00580-17. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/jb.00580-17>.

JANSEN, R.; EMBDEN, J. D. A. V.; GAASTRA, W.; SCHOOLS, L. M. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Molecular Microbiology*, v. 43, n. 6, p. 1565-1575, 2002. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2002.02839.x. Disponível em: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02839.x>.

JIANG, W.; BIKARD, D.; COX, D. et al. RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems. *Nature Biotechnology*, v. 31, p. 233-239, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nbt.2508>.

KA, D.; JANG, D. M.; HAN, B. W.; BAE, E. Molecular organization of the type II-A CRISPR adaptation module and its interaction with Cas9 via Csn2. *Nucleic Acids Research*, v. 46, n. 18, p. 9805-9815, 2018. DOI: 10.1093/nar/gky702. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/gky702>.

KARVELIS, T.; GASIUNAS, G.; SIKSNYS, V. Methods for decoding Cas9 protospacer adjacent motif (PAM) sequences: a brief overview. *Methods*, v. 121-122, p. 3-8, 2017. DOI: 10.1016/j.ymeth.2017.03.009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2017.03.009>.

KARVELIS, T.; SIKSNYS, V. Molecular mechanisms of Type II CRISPR-Cas systems. In: BARRANGOU, R.; VAN DER OOST, J. (Ed.). *CRISPR-Cas: functional and applied aspects*. Washington: ASM Press, 2022. p. 53-69. ISBN 9781683670377. DOI: 10.1002/9781683673798.ch4. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/9781683673798.ch4>.

KAZLAUSKIENE, M.; KOSTIUK, G.; VENCLOVAS, Č.; TAMULAITIS, G.; SIKSNYS, V. A cyclic oligonucleotide signaling pathway in type III CRISPR-Cas systems. *Science*, v. 357, n. 6351, p. 605-609, 2017. DOI: 10.1126/science.aao0100. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/science.aao0100>.

KIM, M.-G.; GO, M.-J.; KANG, S.-H.; JEONG, S.-H.; LIM, K. Revolutionizing CRISPR technology with artificial intelligence. *Experimental & Molecular Medicine*, v. 57, n. 6, p. 1419-1431, 2025. DOI: 10.1038/s12276-025-01462-9. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s12276-025-01462-9>.

KONERMANN, S.; LOTFY, P.; BRIDEAU, N. J.; OKI, J.; SHOKHIREV, M. N.; HSU, P. D. Transcriptome Engineering with RNA-Targeting Type VI-D CRISPR Effectors. *Cell*, v. 173, n. 3, p. 665-676.e14, 2018. ISSN 0092-8674. Disponível em:

<https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.02.033>.

KOONIN, E. V.; DOLJA, V. V.; KRUPOVIC, M.; KUHN, J. H. Viruses defined by the position of the virosphere within the replicator space. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 85, n. 4, p. e00193-20, 2021. DOI: 10.1128/membr.00193-20. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/membr.00193-20>.

KOONIN, E. V.; MAKAROVA, K. S. Origins and evolution of CRISPR-Cas systems. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 374, n. 1772, p. 20180087, 2019. DOI: 10.1098/rstb.2018.0087. Disponível em: <https://doi.org/10.1098/rstb.2018.0087>.

KWAK, N.; PARK, B. J.; SONG, Y.-J. A CRISPR-Cas12a-based diagnostic method for Japanese encephalitis virus genotypes I, III, and V. *Biosensors*, v. 13, n. 8, p. 769, 2023. DOI: 10.3390/bios13080769. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/bios13080769>.

LI, T.; YANG, Y.; QI, H.; CUI, W.; ZHANG, L.; FU, X.; HE, X.; LIU, M.; LI, P.-F.; YU, T. CRISPR/Cas9 therapeutics: progress and prospects. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, v. 8, n. 1, p. 36, 2023. DOI: 10.1038/s41392-023-01309-7. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01309-7>.

LIAO, K.; CHEN, K.; MA, S.; YANG, X.; CHEN, P.; LI, S.; LI, M.; ZHANG, X.; LIN, Y. exoCasMINI: A T5 exonuclease fused CRISPR-Cas12f system with enhanced gene editing efficiency. *iScience*, v. 28, n. 1, p. 113171, 2025. DOI: 10.1016/j.isci.2025.113171. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.isci.2025.113171>.

LOTFY, P.; HSU, P. D. Genome editing with CRISPR-Cas systems. In: BARRANGOU, R.; VAN DER OOST, J. (Ed.). *CRISPR-Cas: functional and applied aspects*. Washington: ASM Press, 2022. p. 163-193. ISBN 9781683670377. DOI: 10.1002/9781683673798.ch11. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/9781683673798.ch11>.

LUO, M. L.; MULLIS, A. S.; LEENAY, R. T.; BEISEL, C. L. Repurposing endogenous type I CRISPR-Cas systems for programmable gene repression. *Nucleic Acids Research*, v. 43, n. 1, p. 674-681, 9 jan. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/gku971>.

MADIGAN, M. T. et al. *Microbiología de Brock*. Tradução: Alice Freitas Versiani et al. Revisão técnica: Flávio Guimarães da Fonseca. 14. ed. Porto Alegre: Artmed, 2016. Recurso eletrônico. ISBN 978-85-8271-298-6.

MAKAROVA, K. S.; GAO, L.; ZHANG, F.; KOONIN, E. V. Unexpected connections between type VI-B CRISPR-Cas systems, bacterial natural competence, ubiquitin signaling network and DNA modification through a distinct family of membrane proteins. *FEMS Microbiology Letters*, v. 366, n. 8, p. fnz088, 2019. DOI: 10.1093/femsle/fnz088. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/femsle/fnz088>

MAKAROVA, K. S.; SHMAKOV, S. A.; WOLF, Y. I.; MUTZ, P.; ALTAE-TRAN, H.; BEISEL, C. L.; PADILHA, V. A.; MIRDITA, M.; SÖDING, J.; KOONIN, E. V. An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems including rare variants. *Nature Microbiology*, v. 10, p. 1-16, 2025. DOI: 10.1038/s41564-024-01889-9. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41564-024-01889-9>.

MAKAROVA, K. S.; WOLF, Y. I.; KOONIN, E. V. The basic building blocks and evolution of

CRISPR-Cas systems. *Biochemical Society Transactions*, v. 41, n. 6, p. 1392-1400, 2013. DOI: 10.1042/BST20130038. Disponível em: <https://doi.org/10.1042/BST20130038>.

MAKAROVA, K. S.; WOLF, Y. I.; KOONIN, E. V. Evolutionary classification of CRISPR-Cas systems. In: BARRANGOU, R.; VAN DER OOST, J. (Ed.). *CRISPR-Cas: functional and applied aspects*. Washington: ASM Press, 2022. p. 13-38. ISBN 9781683670377. DOI: 10.1002/9781683673798.ch2. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/9781683673798.ch2>.

MAKAROVA, K. S.; WOLF, Y. I.; IRANZO, J.; SHMAKOV, S. A.; ALKHNABASHI, O. S.; BROUNS, S. J. J.; CHARPENTIER, E.; CHENG, D.; HAFT, D. H.; HORVATH, P.; MOINEAU, S.; MOJICA, F. J. M.; SCOTT, D.; SHAH, S. A.; SIKSNYS, V.; TERNS, M. P.; VENCLOVAS, Č.; WHITE, M. F.; YAKUNIN, A. F.; YAN, W.; ZHANG, F.; GARRETT, R. A.; BACKOFEN, R.; VAN DER OOST, J.; BARRANGOU, R.; KOONIN, E. V. Evolutionary classification of CRISPR-Cas systems: a burst of class 2 and derived variants. *Nature Reviews Microbiology*, v. 18, n. 2, p. 67-83, 2020. DOI: 10.1038/s41579-019-0299-x. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0299-x>.

MARRAFFINI, L. A. Mechanism of Type III CRISPR-Cas immunity. In: BARRANGOU, R.; VAN DER OOST, J. (Ed.). *CRISPR-Cas: functional and applied aspects*. Washington: ASM Press, 2022. p. 71-84. ISBN 9781683670377. DOI: 10.1002/9781683673798.ch5. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/9781683673798.ch5>.

MATTHEWS, D. Access to CRISPR genome editing technologies: patents, human rights and the public interest. In: ECCLESTON-TURNER, M.; MCNEILL, D. (Ed.). *Access to medicines and vaccines: implementing the human right to health*. Cham: Springer, 2020. p. 51-71. DOI: 10.1007/978-3-030-83114-1_4. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-3-030-83114-1_4.

MAYO-MUÑOZ, D.; PINILLA-REDONDO, R.; BIRKHOLZ, N.; FINERAN, P. C. A host of armor: prokaryotic immune strategies against mobile genetic elements. *Cell Reports*, v. 42, n. 7, p. 112672, 2023. DOI: 10.1016/j.celrep.2023.112672. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2023.112672>.

MOJICA, F. J. M.; DÍEZ-VILLASEÑOR, C.; SORIA, E.; JUEZ, G. Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria. *Molecular Microbiology*, v. 36, n. 1, p. 244-246, 2000. ISSN 0950-382X. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2000.01838.x. Disponível em: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.01838.x>.

MOJICA, F. J. M.; GARRETT, R. A.; BARRANGOU, R.; VAN DER OOST, J. (Ed.). *CRISPR-Cas systems: RNA-mediated adaptive immunity in bacteria and archaea*. Berlin, Heidelberg: Springer, 2013. DOI: 10.1007/978-3-642-34657-6. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-3-642-34657-6>.

MOJICA, F. J. M.; JUEZ, G.; RODRÍGUEZ-VALERA, F. Transcription at different salinities of *Haloferax mediterranei* sequences adjacent to partially modified PstI sites. *Molecular Microbiology*, v. 9, n. 3, p. 613-621, 1993. DOI: 10.1111/j.1365-2958.1993.tb01721.x. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1993.tb01721.x>

MOLINA-SÁNCHEZ, M.; MARTÍNEZ-ABARCA, F.; MILLÁN, V.; MESTRE, M.; STEHANTSEV, P.; STETSENKO, A.; GUSKOV, A.; TORO, N. Adaptive immunity of type VI CRISPR-Cas systems associated with reverse transcriptase–Cas1 fusion proteins.

Nucleic Acids Research, v. 52, 2024. DOI: 10.1093/nar/gkae1154. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/gkae1154>.

MOYA-BELTRÁN, A.; MAKAROVA, K. S.; ACUÑA, L. G.; WOLF, Y. I.; COVARRUBIAS, P. C.; SHMAKOV, S. A.; SILVA, C.; TOLSTOY, I.; JOHNSON, D. B.; KOONIN, E. V.; QUATRINI, R. Evolution of type IV CRISPR-Cas systems: insights from CRISPR loci in integrative conjugative elements of Acidithiobacillia. The CRISPR Journal, v. 4, n. 5, p. 656-672, 2021. DOI: 10.1089/crispr.2021.0050. Disponível em: <https://doi.org/10.1089/crispr.2021.0050>.

MUSTAFA, M. I.; MAKHAWI, A. M. SHERLOCK and DETECTR: CRISPR-Cas systems as potential rapid diagnostic tools for emerging infectious diseases. Journal of Clinical Microbiology, v. 59, n. 3, p. e00745-20, 2021. DOI: 10.1128/JCM.00745-20. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/JCM.00745-20>.

MYHRVOLD, C.; FREIJE, C. A.; GOOTENBERG, J. S.; ABUDAYYEH, O. O.; METSKY, H. C.; DURBIN, A. F.; KELLNER, M. J.; TAN, A. L.; PAUL, L. M.; PARHAM, L. A.; GARCIA, K. F.; BRNAES, K. G.; CHAK, B.; MONDINI, A.; NOGUEIRA, M. L.; ISERN, S.; MICHAEL, S. F.; LORENZANA, I.; YOZWIAK, N. L.; MACINNIS, B. L.; BOSCH, I.; GEHRKE, L.; ZHANG, F.; SABETI, P. C. Field-deployable viral diagnostics using CRISPR-Cas13. Science, v. 360, n. 6387, p. 444-448, 2018. DOI: 10.1126/science.aas8836. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/science.aas8836>.

NOORDERMEER, J. N.; CHEN, C.; QI, L. S. Genetic and epigenetic modulation of gene expression by CRISPR-dCas systems. In: BARRANGOU, R.; VAN DER OOST, J. (Ed.). CRISPR-Cas: functional and applied aspects. Washington: ASM Press, 2022. p. 195-212. ISBN 9781683670377. DOI: 10.1002/9781683673798.ch12. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/9781683673798.ch12>.

O'CONNELL, M. Molecular Mechanisms of RNA Targeting by Cas13-containing Type VI CRISPR-Cas Systems. Journal of Molecular Biology, v. 431, n. 1, 2019. DOI: 10.1016/j.jmb.2018.06.029. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2018.06.029>.

PASTORE, A. I.; BARABÁS, G.; BIMLER, M. D.; MAYFIELD, M. M.; MILLER, T. E. The evolution of niche overlap and competitive differences. Nature Ecology & Evolution, v. 5, n. 3, p. 330-337, 2021. DOI: 10.1038/s41559-020-01383-y. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41559-020-01383-y>.

PAUL, B.; MONTOYA, G. CRISPR-Cas12a: functional overview and applications. Biomedical Journal, v. 43, n. 1, p. 8-17, 2020. DOI: 10.1016/j.bj.2019.10.005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bj.2019.10.005>.

PINILLA-REDONDO, R.; MAYO-MUÑOZ, D.; RUSSEL, J.; GARRETT, R. A.; RANDAU, L.; SØRENSEN, S. J.; SHAH, S. A. Type IV CRISPR-Cas systems are highly diverse and involved in competition between plasmids. Nucleic Acids Research, v. 48, n. 4, p. 2000-2012, 2020. DOI: 10.1093/nar/gkz1197. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/gkz1197>.

PLAGENS, A.; RICHTER, H.; CHARPENTIER, E.; RANDAU, L. DNA and RNA interference mechanisms by CRISPR-Cas surveillance complexes. FEMS Microbiology Reviews, v. 39, n. 3, p. 442-463, 2015. DOI: 10.1093/femsre/fuv019. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/femsre/fuv019>.

PSATHA, N.; REIK, A.; PHELPS, S.; ZHOU, Y.; DALAS, D.; YANNAKI, E.; LEVASSEUR, D. N.; URNOV, F. D.; HOLMES, M. C.; PAPAYANNOPOULOU, T. Disruption of the BCL11A erythroid enhancer reactivates fetal hemoglobin in erythroid cells of patients with β -thalassemia major. *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development*, v. 10, p. 313-326, 2018. DOI: 10.1016/j.omtm.2018.08.003. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2018.08.003>.

RATH, D.; AMLINGER, L.; RATH, A.; LUNDGREN, M. The CRISPR-Cas immune system: biology, mechanisms and applications. *Biochimie*, v. 117, p. 119-128, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2015.03.025>.

RICHTER, C.; DY, R. L.; MCKENZIE, R. E.; WATSON, B. N. J.; TAYLOR, C.; CHANG, J. T.; MCNEIL, M. B.; STAALS, R. H. J.; FINERAN, P. C. Priming in the Type I-F CRISPR-Cas system triggers strand-independent spacer acquisition, bi-directionally from the primed protospacer. *Nucleic Acids Research*, v. 42, n. 13, p. 8516-8526, 2014. DOI: 10.1093/nar/gku527. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/gku527>.

ROTTINGHAUS, A. G.; FERREIRO, A.; FISHBEIN, S. R. S.; DANTAS, G.; MOON, T. S. Genetically stable CRISPR-based kill switches for engineered microbes. *Nature Communications*, v. 13, n. 1, p. 672, 2022. DOI: 10.1038/s41467-022-28163-5. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41467-022-28163-5>.

SANTIAGO-FRANGOS, A.; HALL, L.; NEMUDRAIA, A.; NEMUDRYI, A.; KRISHNA, P.; WIEGAND, T.; WILKINSON, R.; SNYDER, D.; HEDGES, J.; CICHA, C.; LEE, H.; GRAHAM, A.; JUTILA, M.; TAYLOR, M.; WIEDENHEFT, B. Intrinsic signal amplification by type III CRISPR-Cas systems provides a sequence-specific SARS-CoV-2 diagnostic. *Cell Reports Medicine*, v. 2, 2021. DOI: 10.1016/j.xcrm.2021.100319. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2021.100319>.

SHMAKOV, S.; ABUDAYYEH, O. O.; MAKAROVA, K. S.; WOLF, Y. I.; GOOTENBERG, J. S.; SEMENOVA, E.; MINAKHIN, L.; JOUNG, J.; KONERMANN, S.; SEVERINOV, K.; ZHANG, F.; KOONIN, E. V. Discovery and functional characterization of diverse class 2 CRISPR-Cas systems. *Molecular Cell*, v. 60, n. 3, p. 385-397, 2015. DOI: 10.1016/j.molcel.2015.10.008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.10.008>.

SHEN, B.; ZHANG, J.; WU, H.; WANG, J.; MA, K.; LI, Z.; ZHANG, X.; ZHANG, P.; HUANG, X. Generation of gene-modified mice via Cas9/RNA-mediated gene targeting. *Cell Research*, v. 23, n. 5, p. 720-723, 2013. DOI: 10.1038/cr.2013.46. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/cr.2013.46>.

SQUARTINI, A. What can the current global bacterial taxonomy knowledge reveal about the actual (past and present) ecological success of each lineage? *bioRxiv*, p. 2025.09.20.677513, 2025. DOI: 10.1101/2025.09.20.677513. Disponível em: <http://biorxiv.org/content/early/2025/09/21/2025.09.20.677513>.

SRIDHARA, S.; GOSWAMI, H.; WHYMS, C.; DENNIS, J.; LI, H. Virus detection via programmable Type III-A CRISPR-Cas systems. *Nature Communications*, v. 12, artigo 5653, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41467-021-25977-7>.

STALLONE, G.; PONTRELLI, P.; INFANTE, B.; GIGANTE, M.; NETTI, G. S.; RANIERI, E.; GRANDALIANO, G.; GESUALDO, L. Rapamycin induces ILT3(high)ILT4(high) dendritic cells promoting a new immunoregulatory pathway. *Kidney International*, v. 85, n. 4, p.

888-897, 2014. DOI: 10.1038/ki.2013.337. Disponível em:

<https://doi.org/10.1038/ki.2013.337>.

STEENS, J.; ZHU, Y.; TAYLOR, D.; BRAVO, J.; PRINSEN, S.; SCHOEN, C.; KEIJSER, B.; OSSENDRIJVER, M.; HOFSTRA, L.; BROUNS, S.; SHINKAI, A.; VAN DER OOST, J.; STAALS, R. SCOPE enables type III CRISPR-Cas diagnostics using flexible targeting and stringent CARF ribonuclease activation. *Nature Communications*, v. 12, 2021. DOI: 10.1038/s41467-021-25337-5. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41467-021-25337-5>.

STELLA, G.; MARRAFFINI, L. A. Type III CRISPR-Cas: beyond the Cas10 effector complex. *Trends in Biochemical Sciences*, v. 49, n. 1, p. 28-37, 2024. DOI: 10.1016/j.tibs.2023.10.006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2023.10.006>.

TANG, L. Exploring class 1 CRISPR systems. *Nature Methods*, v. 16, n. 11, p. 1079, 2019. DOI: 10.1038/s41592-019-0642-1. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41592-019-0642-1>.

TOKUDA, M.; SHINTANI, M. Microbial evolution through horizontal gene transfer by mobile genetic elements. *Microbial Biotechnology*, v. 17, e14408, 2024. DOI: 10.1111/1751-7915.14408. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/1751-7915.14408>.

UDDIN, F.; RUDIN, C. M.; SEN, T. CRISPR gene therapy: applications, limitations, and implications for the future. *Frontiers in Oncology*, v. 10, p. 1387, 2020. DOI: 10.3389/fonc.2020.01387. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.01387>.

VAN DER OOST, J. Molecular mechanisms of Type I CRISPR-Cas systems. In: BARRANGOU, R.; VAN DER OOST, J. (Ed.). *CRISPR-Cas: functional and applied aspects*. Washington: ASM Press, 2022. p. 39-52. ISBN 9781683670377. DOI: 10.1002/9781683673798.ch3. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/9781683673798.ch3>.

WANG, L.; SHANG, L.; ZHANG, W. Human genome editing after the "CRISPR babies": the double-pacing problem and collaborative governance. *Journal of Biosafety and Biosecurity*, v. 5, n. 1, p. 23-30, 2023. DOI: 10.1016/j.jobb.2022.12.003. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jobb.2022.12.003>.

WILBIE, D.; WALTHER, J.; MASTROBATTISTA, E. Delivery aspects of CRISPR/Cas for in vivo genome editing. *Accounts of Chemical Research*, v. 52, n. 6, p. 1555-1564, 2019. DOI: 10.1021/acs.accounts.9b00106. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.9b00106>.

WYMAN, C.; KANAAR, R. DNA double-strand break repair: all's well that ends well. *Annual Review of Genetics*, v. 40, p. 363-383, 2006. DOI: 10.1146/annurev.genet.40.110405.090451. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.40.110405.090451>.

YANG, J.; LI, X.; HE, Q.; KONG, S.; LIU, Q.; QI, X.; DENG, Y.; TAO, P.; WANG, Y.; ZHANG, Y. Structural basis of type VII CRISPR-Cas system activity. *Nature*, v. 633, n. 8030, p. 465-472, 2024. DOI: 10.1038/s41586-024-07815-0. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41586-024-07815-0>.

YOUNG, J. K.; GASIOR, S. L.; JONES, S. et al. The repurposing of type I-E CRISPR-Cascade for gene activation in plants. *Communications Biology*, v. 2, artigo 383,

2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s42003-019-0637-6>.

XU, Z.; CHEN, S.; WU, W.; WEN, Y.; CAO, H. Type I CRISPR-Cas-mediated microbial gene editing and regulation. *AIMS Microbiology*, v. 9, n. 4, p. 780-800, 2023. DOI: 10.3934/microbiol.2023040. Disponível em: <https://doi.org/10.3934/microbiol.2023040>.

YANG, H.; REN, S.; YU, S.; PAN, H.; LI, T.; GE, S.; ZHANG, J.; XIA, N. Methods favoring homology-directed repair choice in response to CRISPR/Cas9 induced-double strand breaks. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 21, n. 18, p. 6461, 2020. DOI: 10.3390/ijms21186461. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms21186461>.

ZHANG, F. Development of CRISPR-Cas systems for genome editing and beyond. *Quarterly Reviews of Biophysics*, v. 52, p. e6, 2019. DOI: 10.1017/s0033583519000052. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/s0033583519000052>.

ZHANG, J. Y.; GOVINDARAJAN, S.; BONDY-DENOMY, J. Evasion tactics manifested by bacteriophages against bacterial immunity. In: BARRANGOU, R.; VAN DER OOST, J. (Ed.). *CRISPR-Cas: functional and applied aspects*. Washington: ASM Press, 2022. p. 131-144. ISBN 9781683670377. DOI: 10.1002/9781683673798.ch9. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/9781683673798.ch9>.

ZHANG, X.; GARRETT, S. C.; GRAVELEY, B. R.; TERNS, M. P. Unique properties of spacer acquisition by the type III-A CRISPR-Cas system. *Nucleic Acids Research*, v. 50, n. 1, p. 460-476, 2022. DOI: 10.1093/nar/gkab1193. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1193>.

ZHAO, X.; LIU, L.; LANG, J.; CHENG, K.; WANG, Y.; LI, X.; SHI, J.; WANG, Y.; NIE, G. A CRISPR-Cas13a system for efficient and specific therapeutic targeting of mutant KRAS for pancreatic cancer treatment. *Cancer Letters*, v. 431, p. 171-181, 2018. ISSN 0304-3835. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2018.05.042>.

ZHU, Y. Advances in CRISPR/Cas9. *BioMed Research International*, v. 2022, n. 1, p. 9978571, 2022. DOI: 10.1155/2022/9978571. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2022/9978571>.