

Artículo de Revisión

# Edición de Genes y CRISPR-Cas: Aplicaciones, Avances y Desafíos

Joel Horacio Elizondo-Luevano <sup>1,2,\*</sup>, Lizeth Aniram García-Sotelo <sup>2</sup>, Iván Eliot Cárdenas-Paredes <sup>2</sup>, Vanessa de Dios-Romero <sup>2</sup>, Carolina Villanueva-Terán <sup>2</sup>, y Miroslava Kačániová <sup>3,4,\*</sup>

<sup>1</sup> Facultad de Farmacia, Universidad de Salamanca, Campus Miguel de Unamuno S/N, 37007, Salamanca, España; jelizondo@usal.es (J.H.E.-L.).

<sup>2</sup> Facultad de Agronomía, Universidad Autónoma de Nuevo León, Av. Francisco Villa S/N, Col. Ex Hacienda el Canadá, C.P. 66050, General Escobedo, Nuevo León, México; joel.elizondolv@uanl.edu.mx (J.H.E.-L.); lizeth.garciastl@uanl.edu.mx (L.A.G.-S.); ivan.cardenaspr@uanl.edu.mx (I.E.C.-P.); vanessa.dediosmr@uanl.edu.mx (V.D.-R.); carolina.villanuevatr@uanl.edu.mx (C.V.-T.)

<sup>3</sup> Instituto de Horticultura, Facultad de Horticultura e Ingeniería de Paisaje, Universidad Eslovaca de Agricultura, Tr. A. Hlinku 2, 94976 Nitra, Eslovaquia; miroslava.kacaniova@gmail.com (M.K.)

<sup>4</sup> Facultad de Ciencias Médicas y de la Salud, Universidad de Ciencias Económicas y Humanas de Varsovia, Okopowa 59, 01 043 Varsovia, Polonia; m.kcaniova@vizja.pl (M.K.)

\* Correspondencia: J.H.E.-L. & M.K.

**Resumen:** La tecnología CRISPR-Cas es una herramienta efectiva para la edición de genes. Se realizó una revisión de literatura en bases de datos (Google Académico, PubMed, Scielo y Science Direct), abarcando los años 2011 a 2024, utilizando palabras clave como 'Ingeniería genética', 'Agricultura' y 'CRISPR-Cas'. El método CRISPR-Cas9 emplea dos tipos de RNA y una endonucleasa Cas, que corta el ADN extraño y lo añade a la secuencia CRISPR como espaciadores. La secuencia CRISPR se transcribe en crARN y tracrARN, formando el complejo gARN. El sistema CRISPR se introduce en la célula mediante plásmidos, ARN o ribonucleoproteínas, y una secuencia objetivo permite que el CRISPR-Cas9 entre al núcleo. Este método es útil para la edición de genes específicos de interés científico y biotecnológico.

**Palabras Clave:** Ingeniería genética, CRISPR, Agricultura, ARN guía, PAM.

## Gene Editing and CRISPR-Cas: Applications, Advances and Challenges

**Abstract:** The CRISPR-Cas technology is an effective tool for gene editing. A literature review was conducted in databases (Google Scholar, PubMed, Scielo, and Science Direct), covering the years 2011 to 2024, using keywords like 'Genetic Engineering', 'Agriculture', and 'CRISPR-Cas'. The CRISPR-Cas9 method uses two types of RNA and a Cas endonuclease, which cuts foreign DNA and adds it to the CRISPR sequence as spacers. The CRISPR sequence is transcribed into crRNA and tracrRNA, forming the gRNA complex. The CRISPR system is introduced into the cell via plasmids, RNA, or ribonucleoproteins, and a target sequence allows CRISPR-Cas9 to enter the nucleus. This method is useful for editing specific genes of scientific biotechnology interest.

**Keywords:** Genetic engineering, CRISPR, Agriculture, guide RNA, PAM.

## 1. Introducción

La edición del genoma ha impactado en investigaciones sobre todo en biología, gracias a la nueva capacidad de editar genomas específicos en seres vivos; En la última década, se han explorado múltiples herramientas de ingeniería genética para editar desde genomas complejos hasta simples. Una herramienta que ha cobrado importancia es el CRISPR-Cas; utilizado en genética por poseer características como: Alta eficiencia, facilidad de uso y especificidad. Además de utilizarse para agregar alelos deseables y eliminar alelos indeseables simultáneamente de manera conjunta (Manghwar et al., 2019). En esta revisión sistemática, se analizarán las aplicaciones actuales, los avances recientes y los desafíos en el campo de la edición de genes utilizando CRISPR-Cas, con un enfoque particular en la agricultura.

El sistema CRISPR-Cas9 es utilizado en la edición del genoma guiada por ARN que consta de una nucleasa Cas9 y un ARN de guía única (sgARN). Al emparejar bases con una secuencia objetivo de ADN el sgARN permite a la endonucleasa Cas9 reconocerla y cortar una secuencia de ADN objetivo determinada, generando rupturas de doble hebra y se activa mecanismos de reparación celular y mutaciones en las rupturas de doble hebra o cerca de ellos (Bao et al., 2019).

La edición genética abarca diversas áreas de investigación, y gracias a la herramienta CRISPR-Cas las aplicaciones se vieron expandidas en las múltiples competencias. Dichas aplicaciones abarcan áreas como medicina, producción agropecuaria, microbiología e industria alimentaria. Específicamente la herramienta CRISPR-Cas9 permite modificar la secuencia de ADN para mejorar las expresiones genéticas o fenotipos de organismos vivos, lo que lo convierte en una metodología vital para la investigación de la función genética, modificación de caracteres y la producción de nuevas sustancias vitales (Zhu, 2022).

En el área de producción vegetal, se considera esta herramienta como un sustituto a los métodos tradicionales debido a que el tiempo de obtención puede reducirse de meses a semanas y sólo se transfieren las propiedades deseadas. Suele aplicarse para mejorar el rendimiento de un cultivo de uso o consumo humano, así como añadir características de resistencia o tolerancia a condiciones de estrés abiótico y biótico (Herrera-Cabrera et al., 2021). Dicha edición genética se ha llevado a cabo con éxito en múltiples ejemplares como son *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*), tabaco (*Nicotiana tabacum*), arroz (*Oryza sativa*) y trigo (*Triticum aestivum*) (Zhu, 2022).

Una de las limitaciones que tiene la edición del genoma en plantas es el proceso de transformación, por lo tanto, en los próximos años podría verse un número creciente de opciones para la edición del genoma de plantas sin ADN y evitando el cultivo de tejidos (Huang Holger Puchta et al., 2021). Recientemente, se logró un avance importante mediante la transformación mediada por *Agrobacterium* de un ADN-T con tres factores estimulantes del crecimiento, *Wus2*, *STM* e *ipt*, mientras que la edición se inducía simultáneamente. Por lo tanto, los brotes editados con el genoma podrían regenerarse a partir de plantas cultivadas en el suelo sin un paso de cultivo de tejidos (Maher et al., 2019).

Otro enfoque reciente con el objetivo de evitar el cultivo de tejidos ha sido la utilización de un vector de virus ARN del *virus del cascabel del tabaco* (Ellison et al., 2020). Los autores lograron la edición genética en las hojas infectadas y también encontraron frecuencias de edición más altas en las partes superiores de las plantas que en la infección inicial. Sin embargo, aunque CRISPR-Cas9 ha sido una gran herramienta que ha revolucionado la edición genética, se han abierto debates en los cuales se plantean preocupaciones y desafíos de esta. Algunas de las complicaciones que se han mostrado han sido los *off-target effects*, ya que esta tecnología no funciona siempre de manera específica, y puede afectar genes no deseados (Liang et al., 2019).

En un futuro muy cercano veremos mejoras importantes en nuestra caja de herramientas de edición del genoma. Esto nos permitirá proporcionar mejores herramientas para producir cultivos que necesiten utilizar menos pesticidas y que los cultivos sean más tolerantes al estrés ambiental debido al calentamiento global (Huang Holger Puchta et al.,

2021). Esta revisión sistemática proporcionará una visión completa y actualizada de la tecnología CRISPR-Cas y su aplicación en la agricultura, destacando tanto sus logros recientes como los desafíos pendientes y las futuras direcciones de investigación. En el marco metodológico de esta revisión, elementos para la investigación clave se entiendan aspectos de CRISPR-Cas9 que son fundamentales, así como la identificación de sus aplicaciones en la agricultura con el fin de evaluar el estado actual del conocimiento de CRISPR-Cas9.

## 2. Métodos

La búsqueda de la literatura se realizó en marzo del 2024, sin restricción de fecha ni de idioma, en las bases de datos especializadas Pubmed, Embase, Scielo, Science Direct, MDPI, Frontiers, Springer Link y en las siguientes fuentes complementarias en búsqueda de literatura motores de búsqueda genéricos (Google y Google Académico). Es una estrategia de búsqueda genérica con términos de lenguaje libre adaptada a diferentes fuentes de información, utilizando palabras clave como 'Ingeniería genética', 'Agricultura', 'ARN guía', 'CRISPR-Cas', entre otros. La búsqueda se limitó a artículos correspondientes al período 2011 al 2024.

## 3. Principios básicos de la tecnología CRISPR-Cas

### 3.1 Descripción de los componentes principales del sistema CRISPR-Cas

CRISPR-Cas, es un conjunto de secuencias de ADN encontradas en bacterias y arqueas, las cuales son parte de un sistema de inmunidad adaptativa que les permite defenderse de virus (Pickar-Oliver & Gersbach, 2019). La inmunidad adaptativa se dirige específicamente a agentes infecciosos, se caracteriza por ser capaz de adaptarse y recordar encuentros previos con patógenos específicos, esto permite una respuesta rápida y eficaz ante infecciones constantes (Blanchard et al., 2020). La característica que destaca el sistema CRISPR-Cas son las repeticiones idénticas de ADN que son separados regularmente por estructuras conocidas como espaciadores (Figura 1). El CRISPR es una secuencia pequeña cuenta con una longitud de 27 a 50 nt. Casi todos los sistemas tienen repeticiones de aproximadamente 30pb. Por lo general la secuencia repetida es palindrómica, y es capaz de formar una estructura llamada horquilla (Barrangou, 2013).

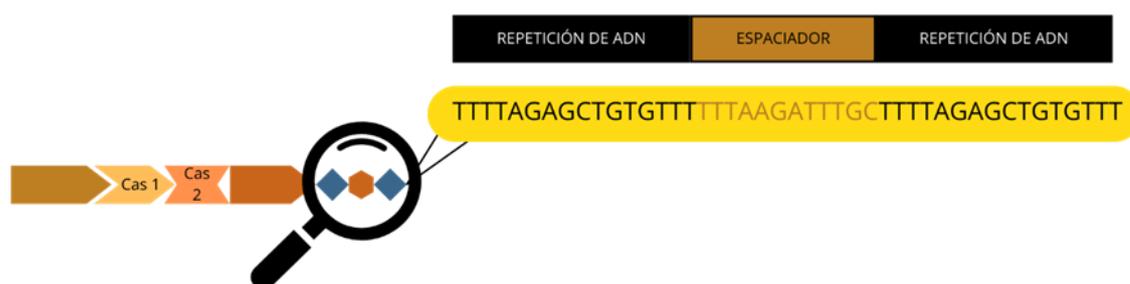


Figura 1. Diagrama general sobre el sistema CRISPR (Creado en Canva).

Están separados por secuencias únicas llamadas espaciadores, los espaciadores proceden de secuencias de genes de virus y plásmidos, Los proto espaciadores están enseguida de un motivo adyacente proto espaciador (PAM) conservado de corta longitud (2-5 nt) (Fineran & Charpentier, 2012). En la actualidad se clasifican los sistemas CRISPR-Cas de bacterias y arqueas por su estructura y las funciones de las proteínas Cas (Liu et al., 2020), (Figura 2).

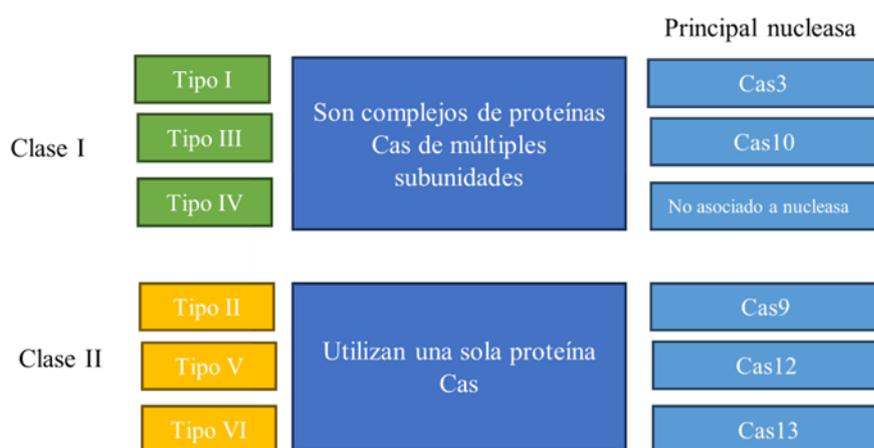


Figura 2. Clasificación de tipos de proteínas Cas (Creado en Canva).

Cas 1 y Cas 2 están presentes en los tipos de clasificación, su función está relacionada con la adquisición del espaciador. Específicamente Cas1 tiene actividad nucleasa en ADN de una sola hebra, uniones Holliday las cuales son un intermediario importante en la recombinación homóloga, este proceso favorece la diversidad genética al intercambiar genes de dos cromosomas, horquillas de replicación y en la formación de espaciadores (Barrangou, 2013) (Figura 3). La estructura de CRISPR/Cas9 es de tipo II es relevante y al estar clasificada en clase II y solo se utiliza una sola proteína Cas, facilitan el estudio de esta estructura (Mohr et al., 2016). Sistema CRISPR-Cas de Tipo II: el gen principal es el Cas9, cuya función es codificar una proteína multidominio y combinar todas las funciones de efectores con el corte de ADN diana fundamental para que se madure el crARN; endonucleasa de ADN guiada por ARN que se requiere para la interferencia y la inmunidad en sistemas de tipo II. Estudios han revelado que la unión del gARN regula la función de la proteína Cas9 al inducir un gran reacomodo de la proteína., hoy en día, Cas9 de *Streptococcus pyogenes* (*Sp Cas9*) es la proteína más estudiada y por lo tanto utilizada para la edición del genoma (Nozawa et al., 2011).

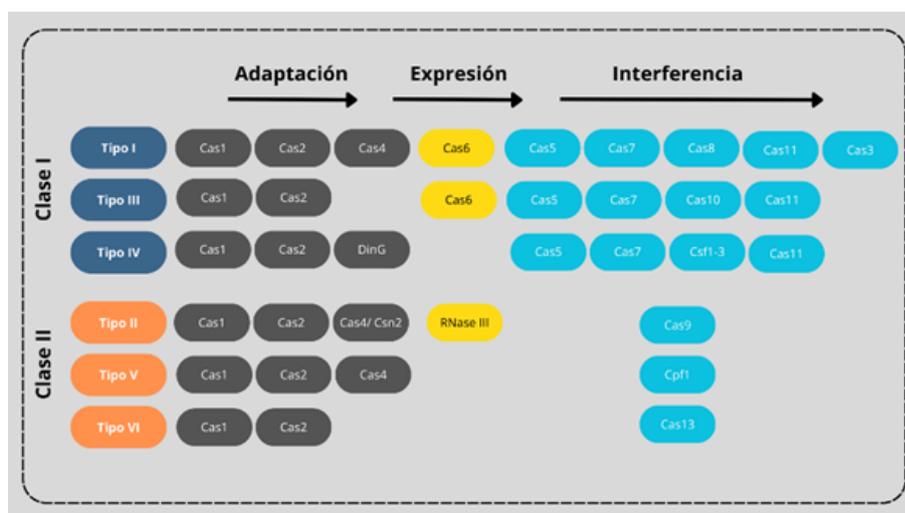


Figura 3. Proteínas Cas involucradas en las diversas etapas de CRISPR (Bhattacharya & Satpati, 2023).

Arquitectura de la proteína Cas9, cuenta con una longitud de 800 a 1,400 aminoácidos, contiene dos dominios homólogos a las endonucleasas HNH y RuvC fundamentales para realizar el corte del ADN diana (Jinek et al., 2012). Cas9 codifica una proteína que funciona en la biogénesis de crARN y el ADN diana. Los sistemas tipo II cuentan con el tracrARN que incluye una secuencia de 25 nt complementaria a la repetición CRISPR y posterior a eso se madura y procesa el crARN mediante una endoribonucleasa ARNseIII de mantenimiento que realiza el corte (Mendoza-Téllez et al., 2022). El sistema CRISPR-Cas9 es un complejo formado por ARN guía único formado por tracrARN y crARN, dicha

estructura sirve para realizar una edición en el genoma. La endonucleasa Cas9 unida a sgRNA busca el objetivo de doble hebra ADN mediante el escaneo de un proto espaciador de trinucleótidos corto adyacente motivo. El complejo Cas9 sgRNA se dirige al ADN en dos fases: El complejo Cas9 sgRNA se une transitoriamente al ADN de forma independiente de la secuencia en diversas ubicaciones a través de colisiones al azar para escaneo del PAM secuencia. Al llegar a la secuencia objetivo se une y el resto de los complejos se disgregan rápidamente de los que no son PAM, posterior a eso se inicia la fase de complementariedad del ADNt con sgRNA para la formación heterodúplex. (Barrangou, 2013).

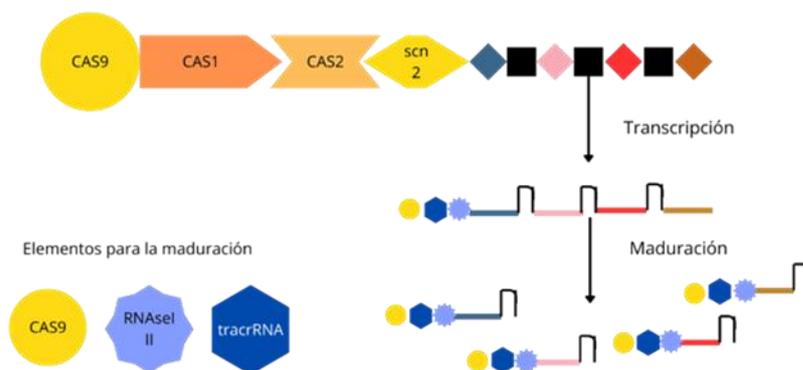


Figura 4. Mecanismo de acción de la proteína Cas9 (Creado en Canva).

### 3.2 Mecanismo de acción de CRISPR-Cas

El mecanismo mediado por CRISPR-Cas se divide en 3 etapas: adaptación, en cual se incorporan espaciadores en el locus CRISPR, expresión, donde el sistema se prepara para la acción expresando los genes Cas y transcribiendo el CRISPR en crARN maduro con la ayuda de proteínas Cas e interferencia, donde el ácido nucleico objetivo es reconocido y destruido mediante la acción combinada del crARN y proteínas Cas (Figura 5) (D. Rath et al., 2015).

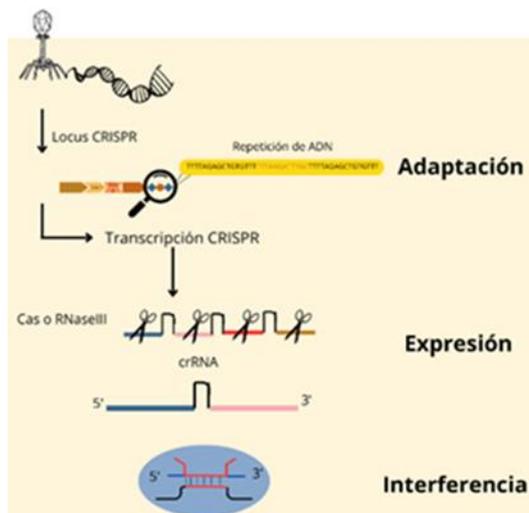


Figura 5. Inmunidad CRISPR-Cas 1 (Creado en Canva).

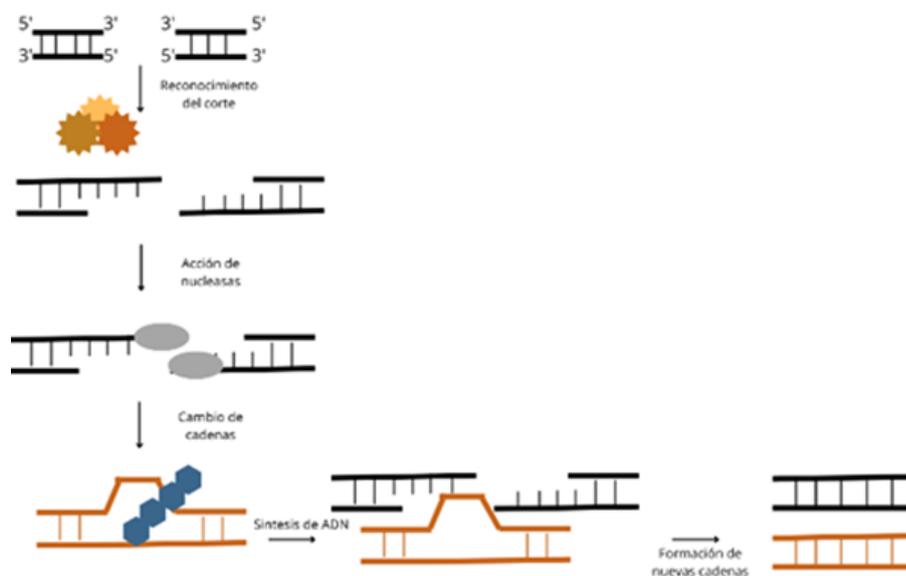
Adaptación: inserción de nuevos espaciadores en el locus CRISPR.

Expresión: transcripción del locus CRISPR y procesamiento del ARN CRISPR.

Interferencia: detección y degradación de elementos genéticos móviles mediante ARN CRISPR y proteínas Cas.

La edición del genoma mediante nucleasas CRISPR-Cas9 se basa en la reparación de rupturas de doble cadena de ADN (DSB). En células eucariotas, los DSB se reparan mediante dos mecanismos principales: la reparación dirigida por homología (HDR) y la unión de extremos no homólogos (NHEJ). Los cortes de doble cadena es uno de los daños más severos al ADN, estos pueden emerger por motivos exógenos y endógenos. Los DBS pueden provocar inestabilidad en los genes y pérdida de material genético incluso en eucariotas puede inactivarse genes de vital importancia, lo que ocasionaría inducir una muerte celular programada mediante apoptosis. Por suerte, las células cuentan con sistemas enzimáticos para reparar ADN si es necesario (Tafurt-Cardona & Marin-Morales, 2015).

- A. Reparación mediante recombinación homóloga HR:** Mecanismo que detecta y repara daños causados por agentes físicos, químicos y radicales libres, particularmente las rupturas de doble cadena (DSB) en la fase G2 del ciclo celular. Durante esta fase, el material genético se condensa y organiza, preparándose para la división celular, y la célula contiene el doble de material genético. La alta eficiencia de las reparaciones se debe a que las cromátidas hermanas que tienen información idéntica, se activan una serie de reacciones y proteínas de reparación que bloquean el ciclo celular (Tafurt-Cardona & Marin-Morales, 2015).
- B. Reparación por recombinación homóloga:** En eucariotas, las rupturas de doble cadena (DSB) son reconocidas por un complejo proteico llamado MRN, compuesto por RAD50, MRE11 y NBS1. Este complejo posee endonucleasas que degradan el ADN, generando cadenas sencillas (Tafurt-Cardona & Marin-Morales, 2015). La proteína RAD52 protege el ADN de las exonucleasas inespecíficas, y RAD51, en presencia de ATP, sintetiza un filamento de núcleo proteico que busca la secuencia homóloga y cataliza el intercambio y apareamiento de las cadenas junto con RAD52. Finalmente, se forma una estructura de cadenas entrecruzadas denominada intermediario de Holliday, completando el proceso de reparación (Figura 6) (Tafurt & Marín, 2015). A nivel molecular, se han identificado las proteínas XRCC2, XRCC3, RAD51B, RAD51C y RAD51, además de las quinasas ATR y ATM, que reconocen los DSB (Tafurt-Cardona & Marin-Morales, 2015).
- C. Reparación mediante extremos no homólogos:** En eucariotas, el sitio de corte es reconocido por las proteínas KU70 y KU80, que mantienen ambas cadenas de ADN unidas. Posteriormente, la ligasa IV repara la ruptura junto con el complejo XRCC4, que se une al extremo de ADN lesionado y une las cadenas (Figura 7) (Tafurt-Cardona & Marin-Morales, 2015).



**Figura 6.** Representación de la reparación por recombinación homóloga (Tafurt-Cardona & Marin-Morales, 2015).

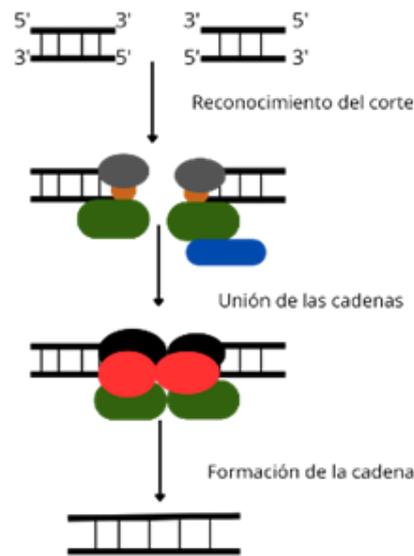


Figura 7. Reparación de ADN por extremos no homólogos (Tafurt-Cardona & Marin-Morales, 2015).

## 4. Aplicaciones de la edición de genes en agricultura

### 4.1 Incremento en el rendimiento

Múltiples factores afectan el rendimiento de los cultivos, incluyendo la manipulación de la homeostasis de las citoquininas. En *Oryza sativa* (arroz), la edición del dominio C terminal de LOGL5, que codifica una enzima activadora de citoquininas, ha mejorado el rendimiento del grano en diversas condiciones ambientales (C. Wang et al., 2020). Asimismo, la eliminación del gen que codifica la citoquinina oxidasa/deshidrogenasa (CKK), responsable de la degradación de citoquininas, ha generado fenotipos de alto rendimiento en trigo (Z. Zhang et al., 2019).

Desarrollar cultivos más tolerantes a la sequía es otro reto clave para mejorar el rendimiento. La tolerancia a la sequía está relacionada con la fitohormona etileno, que regula la respuesta al estrés hídrico y temperaturas altas (Kawakami et al., 2013). Disminuir la sensibilidad al etileno puede aumentar el rendimiento. Estudios se han centrado en los genes ARGOS, que regulan negativamente la respuesta al etileno y modulan la transducción de señales, lo que mejora el rendimiento del grano en maíz (Shi et al., 2017).

### 4.2 Mejora en la calidad de los cultivos

Uno de los principales desafíos en la agricultura es mejorar la calidad de los cultivos sin comprometer la producción (Aparicio et al., 2021). En cereales como trigo, cebada y centeno, las proteínas del gluten pueden causar enfermedad celíaca en individuos susceptibles. Dado que las proteínas del gluten están codificadas por aproximadamente 100 loci en el genoma del trigo, los métodos tradicionales no logran reducir significativamente el contenido de gluten. Sin embargo, la tecnología CRISPR-Cas permite editar regiones específicas de los genes del gluten, generando líneas de trigo con hasta un 85% de reducción en el potencial alergénico (Sánchez-Artigas et al., 2021).

### 4.3 Resistencia a enfermedades

La modificación genética ofrece soluciones para enfrentar enfermedades en plantas, mediante la introducción de genes de resistencia dominantes o la alteración de factores de susceptibilidad. La edición de estos factores con CRISPR-Cas se presenta como un enfoque prometedor para proteger las plantas del estrés biótico (Aparicio et al., 2021). Por ejemplo, *Blumeria graminis f. sp. tritici*, el hongo causante del mildiú polvoriento en trigo se combate editando el gen EDR1 (Enhanced Disease Resistance 1), que codifica una MAPK quinasa que inhibe la respuesta defensiva. Utilizando

CRISPR-Cas, se han obtenido plantas resistentes mediante mutaciones simultáneas en tres dominios homólogos de EDR1 (Y. Zhang et al., 2017). Además, CRISPR-Cas9 puede fragmentar genomas de virus vegetales de ADN, proporcionando resistencia viral. No obstante, se requiere una evaluación cuidadosa, ya que la tecnología puede generar plantas con resistencia limitada o nula, lo que puede acelerar la aparición de fugas virales (Mehta et al., 2019).

#### 4.4 Resistencia a herbicidas

Comparado con los métodos tradicionales de transgénesis que introducen genes foráneos como el bar, que codifica una fosfonitrocina N-acetiltransferasa, la edición dirigida mediante CRISPR-Cas de genes endógenos de la planta ofrece ventajas significativas, como flexibilidad, rapidez, bajo costo y naturaleza no transgénica (Aparicio et al., 2021). La enzima acetolactato sintasa (*als*) (Kuang et al., 2020), clave en la biosíntesis de aminoácidos de cadena ramificada y diana de herbicidas como sulfonilureas e imidazolinonas, puede conferir tolerancia a herbicidas mediante mutaciones específicas (Powles et al., 2010). A diferencia de los métodos convencionales, CRISPR permite generar germoplasma nuevo rápidamente, eliminando elementos genéticos negativos o introduciendo mutaciones de ganancia de función en regiones específicas del genoma (Aparicio et al., 2021).

### 5. Avances recientes en la tecnología CRISPR-Cas

#### 5.1 Desarrollo de variantes de CRISPR-Cas con nuevas funcionalidades

La herramienta de edición de genes CRISPR-Cas es altamente empleada por su simplicidad, escalabilidad y asequibilidad en los proyectos de biotecnología y medicina. Dicha técnica posee múltiples variantes con diferentes funcionalidades y aplicaciones. Actualmente, el sistema SpCas9, es el más empleado cotidianamente debido a que posee amplia compatibilidad PAM y alta actividad. Sin embargo, las aplicaciones se ven comprometidas por sus efectos secundarios no deseados o las limitaciones por su falta de su secuencia PAM (NGG). Por lo tanto, existen variantes en desarrollo con el objetivo de cubrir dichas limitaciones e intentar optimizar el uso de la herramienta CRISPR-Cas (Allemailem et al., 2023). Los sistemas CRISPR-Cas en los que se profundizará son CRISPR-Cas12a, CRISPR-Cas13, CRISPR-CasX y CRISPR-CasPhi.

**Tabla 1.** Variedades actuales de las proteínas CRISPR-Cas.

Variable	Estructura	Blanco	Ventajas	Referencias
<b>CRISPR-Cas12a</b>	Es una endonucleasa de ARN (sgARN) proveniente de <i>Prevotella</i> y <i>Francisella</i> , proteína Cas12a y ARN guía.	Se dirige a secuencias seguidas por el motivo de reconocimiento de protospacer (PAM) rico en tiamina.	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Amplía el rango de secuencias a editar, porque lo que aumenta la flexibilidad y capacidad de orientación.</li> <li>▪ Produce múltiples cortes con extremos romos.</li> <li>▪ Estructura compacta.</li> </ul>	Alok et al., 2020 Safari et al., 2019
<b>CRISPR-Cas13</b>	Conformado por proteína Cas13 y un ARN CRISPR (crARN). La proteína tiene	Se dirige al ARN.	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Capacidad de dirigirse al ARN, contrario a las otras proteínas Cas que se dirigen a ADN.</li> </ul>	Huang et al., 2022 Hillary & Ceasar, 2023

	dos dominios, uno de reconocimiento de ARN y otro de actividad de corte nucleasa.		<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Altamente específico para inducir mutaciones específicas.</li> <li>▪ Como su objetivo es el ARN tiene distintas aplicaciones como es la detección genética de enfermedades virales o infecciosas.</li> </ul>	
<b>CRISPR-CasX</b>	Contiene proteína CasX desactivada, sgARN y un sustituto de ADNc.	Se dirige a secuencias específicas de ADN o ARN.	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Su tamaño menor a 1000 aa</li> <li>▪ Versatilidad</li> <li>▪ Facilidad de edición genética puntual.</li> </ul>	Liu et al., 2020 Yang & Patel, 2019
<b>CRISPR-CasPhi</b>	Posee proteína $\phi$ asociada con un sistema CRISPR.	Se dirige hacia ADN viral utilizando un sgARN.	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Inusualmente pequeño.</li> <li>▪ Eficaz en la defensa contra virus específicos.</li> </ul>	Pausch et al., 2020

**ARN:** Ácido ribonucleico, **ADN:** Ácido desoxirribonucleico, **sgARN:** guías de ARN de una cadena, **PAM:** Motivo de reconocimiento protospacer, **crARN:** ARN cortos de CRISPR.

### 5.2 Estrategias para aumentar la precisión de la edición génica

Con el gran uso de los mecanismos CRISPR-Cas en la edición génica podemos notar sus grandes ventajas y beneficios que nos proporcionan como la alta especificidad, eficiencia y rentabilidad, no obstante, conforme su práctica aumenta, también se han denotado limitaciones y/o áreas de mejora para mantener esta herramienta optimizada y que incremente la aplicación en múltiples campos de la ciencia (Chávez-Jacobo, 2018). Si la proteína Cas entra o sale del sitio PAM depende del sgARN, el tipo de proteína, la concentración de ribonucleoproteína, la temperatura de edición y el tiempo de acción. Uno de los efectos fuera del objetivo no deseados son la escisión, esto puede ser originado por el mal diseño del sgARN, baja especificidad de las proteínas Cas o la expresión excesiva de CRISPR-Cas (Sánchez-Artigas et al., 2021). Se propone la modificación de sgARN empleando bases de datos donde estadísticamente se pueda diseñar el modelo más preciso. Una de las transformaciones más empleadas es la eliminación o adición de nucleótidos en los extremos 5' o 3' para reducir las mutaciones fuera del objetivo, esto se logra porque se disminuye la afinidad de unión del sgARN pero se aumenta la unión de Cas9 a la secuencia objetivo, resultando en un aumento de la especificidad sin comprometer la eficiencia de edición genómica (Feng et al., 2022).

Otra estrategia es la identificación e implementación de diferentes variantes de la proteína Cas mediante el estudio del metabolismo empleadas en los microorganismos con la finalidad de encontrar aquellas que posean las mejores características o en efecto, tengan un amplio espectro de posibilidades de ser empeladas (Mattiello et al., 2022). Por otra parte, la concentración de ribonucleoproteína (RNP) es decisiva, si hay altas cantidades suelen aumentarse los efectos fuera del objetivo, y si las cantidades son bajas se reduce la eficiencia de escisión. Usualmente se prefiere que la cantidad sea baja mediante el uso de diferentes promotores o reducir la concentración baja de plásmidos (Hsu et al.,

2013). Por último, optimizar las condiciones de reacción, como es la temperatura y el tiempo que pueden afectar de manera positiva o negativamente. Se ha demostrado que reducir el tiempo de edición y mantener la temperatura estándar reduce las limitaciones y mejora la eficiencia (F. Zhang, 2019).

### 5.3 Aplicaciones emergentes de CRISPR-Cas en agricultura

La aplicación de esta herramienta va más allá de la edición genética, también se emplea para la modificación de la expresión génica y la epigenética de las plantas, ampliando las posibilidades para la mejora de cultivos de manera precisa y efectiva (Lee et al., 2019). La edición de secuencias implicadas en la regulación resulta un enfoque interesante para la mejora de la expresión génica. Se pueden eliminar los sitios represores dentro del gen de interés para dar como resultado una transcripción más estable y, por lo tanto, una mejoría en el cultivo (Lee et al., 2019). Como ocurre con la regulación de los miARN, los cuales regulan la estabilidad y traducción de transcritos en plantas, al eliminarlos mediante CRISPR-Cas permite mejorar rasgos como el rendimiento, calidad y resistencia al estrés, con diferencia a la modificación usual, esta técnica concede un ajuste fino de los niveles de expresión y traducción (Tyumentseva et al., 2023). No obstante, este enfoque puede resultar en fenotipos pleiotrópicos o indeseables, por lo que en la actualidad se siguen buscando alternativas más efectivas y específicas al momento de querer mejorar genéticamente un cultivo (Ferreira & Reis, 2023).

En cuanto a los cambios epigenéticos, son las modificaciones en los genes sin alterar la secuencia de ADN a causa de la edad o la exposición a factores ambientales, y son hereditarios (Lee et al., 2019; Tyumentseva et al., 2023). Por lo que la edición epigenética mediada por CRISPR-Cas es la reprogramación transcripcional en los sitios específicos empleando enzimas epigenéticas fusionadas con Cas de catalítica (dCas) para obtener beneficios como la tolerancia al estrés abiótico, y el mejoramiento del crecimiento y desarrollo de las plantas (Jogam et al., 2022). Las características de la reproducción asexual de las plantas favorecen el mantenimiento y estabilidad de las modificaciones del genoma. La epigenética tiene gran potencial para la investigación y futuras aplicaciones en la agricultura, debido a que puede estudiar la función de los factores de transcripción, regulación de genes enzimáticos en rutas metabólicas, y optimizar la expresión de genes funcionales que confieren características de resistencia (Qi et al., 2023).

## 6. Consideraciones éticas y regulatorias

### 6.1 Discusión sobre los aspectos éticos y sociales de la edición de genes en agricultura

La edición genética mediante CRISPR-Cas, sin la inserción de genes foráneos, se considera menos invasiva y, por lo tanto, moralmente más aceptable (Bartkowski et al., 2018). Estas tecnologías ofrecen ventajas medioambientales y económicas significativas, como el aumento del rendimiento de cultivos y la reducción en el uso de pesticidas y herbicidas. Sin embargo, si el acceso a estas tecnologías se restringe a unos pocos, podría beneficiar principalmente a grandes productores, dejando a pequeños agricultores y ganaderos en desventaja (Iáñez Pareja, 2016). Además, debido a las ventajas que presentan los cultivos comerciales alterados genéticamente respecto a los nativos, existe el riesgo potencial de que las semillas nativas sean gradual e inconscientemente desplazadas, lo que representa un peligro latente para la soberanía alimentaria de los pueblos, recordemos que la autosuficiencia en alimentos es la necesidad más vital en una comunidad y aprovechar de esa dependencia y susceptibilidad no sería para nada ético ni moral (Casquier & Ortiz, 2012).

### 6.2 Marco regulatorio actual y perspectivas futuras para la utilización de CRISPR-Cas en cultivos agrícolas.

Hoy en día existen regulaciones a las que se encuentran sometidos los organismos genéticamente modificados (OGM). En países como Canadá y Estados Unidos, la legislación sobre organismos modificados genéticamente (OMG) excluye a las plantas producidas mediante edición genética, ya que estas no contienen ADN foráneo (Waltz, 2018). En contraste, el Tribunal de Justicia de la Unión Europea (TJUE) ha dictaminado en el caso C-528/16 que los organismos

obtenidos mediante técnicas de mutagénesis deben ser regulados como OMG y están sujetos a la directiva correspondiente, debido a que estas técnicas alteran el material genético de manera que no ocurre de forma natural.

CRISPR-Cas está avanzando rápidamente, con investigaciones centradas en aumentar su eficiencia y reducir los efectos *off-target*. Las estrategias principales para mitigar estos efectos incluyen ajustar el tamaño del ARN guía, usar ribonucleoproteínas (RNP) y modificar la proteína Cas así como optimizar su concentración (Hsu et al., 2013). Mientras tanto, la mayoría de los estudios se enfocan en el silenciamiento de genes, la mutagénesis dirigida a través de reparación dirigida por homología (HDR) sigue siendo un reto debido a su baja probabilidad de ocurrencia en plantas y las dificultades en la transferencia de componentes al núcleo celular (Steinert et al., 2016). No obstante, se han logrado algunos avances en esta área.

### **6.3 Desafíos relacionados con la bioseguridad y la gestión de riesgos ambientales asociados con los cultivos editados genéticamente**

Aunque CRISPR-Cas genera las posibilidades de mejorar cultivos y resolver problemáticas agrícolas, se tienen algunas preocupaciones respecto bioseguridad y biodiversidad. Esto es a raíz de que los genes editados formarán parte del ADN de la planta, la cual se espera que la producción escale a niveles exponenciales, siendo así expuesto al medio natural (Karavolias Nicolás, 2022).

Al tener contacto con el ambiente, existe un sinnúmero de posibilidades, desde la propagación de genes que pueden alterar ecosistemas naturales, eliminar o desplazar especies silvestres, generar resistencia y posible evolución de plagas y malas hierbas, dificultad en la regulación y/o monitoreo de cultivos, hasta el desconocimiento de la repercusión del consumo de dichos cultivos en humanos, animales, insectos u otras especies (Casquier & Ortiz, 2012). Es por eso por lo que se han implementado alternativas y generado teorías de investigación para reducir estos posibles efectos secundarios. En lo cual ha destacado la reducción de los efectos fuera del objetivo donde se buscan optimizar la herramienta para tener mayor fidelidad o utilizar sistemas de vectores alternativos menos riesgosos en la transferencia (J. Rath, 2018).

A pesar de lo dicho, los riesgos de contención siempre estarán presentes por lo que siempre será fundamental garantizar la contención de los cultivos genéticamente modificados o de patógenos hasta que se encuentre otra herramienta que pueda facilitar la proyección de las consecuencias a largo plazo por utilizar estos organismos genéticamente modificados y descartar cualquier peligro inminente. Por último, y no menos relevante, siempre será de alta relevancia la regulación y normalización por parte gubernamental, evitando las lagunas legales para que los avances científicos se realicen hacia el avance de la sociedad moderna y no al contrario (Iáñez Pareja, 2016).

## **7. Desafíos y limitaciones:**

La tecnología de CRISPR-Cas ha demostrado ser una técnica revolucionaria para la edición genética la cual puede ser de gran ayuda en el área de la agricultura. Sin embargo, esta puede presentar ciertos desafíos que pueden limitar su uso en ciertas especies. Dentro de los desafíos se pueden encontrar el *off-target effect*, algún tipo de obstáculo técnico, económico, logístico o biológico, entre otros (F. Zhang et al., 2014).

### **7.1 Off-target effects y estrategias para minimizarlos.**

Las mutaciones fuera del objetivo u *Off-target effect*, como se conocen en inglés, son una de las principales limitaciones que la tecnología CRISPR-Cas9 presenta. Por lo general este tipo de mutaciones o translocaciones de los cromosomas pueden ser observadas en tasas muy altas, lo que suele amenazar la especificidad de CRISPR-Cas9 (Fernanda Lammoglia-Cobo et al., 2016). En la actualidad se ha buscado minimizar este tipo de mutaciones, por lo general se trata de mejorar la especificidad de la tecnología CRISPR-Cas9 mediante la optimización de los componentes de edición genética. Las principales estrategias para la reducción de *off-targets* incluyen el diseño y la modificación de sgRNA, la mejora de enzimas de Cas9, edición génica independiente de DSB y mejora de los métodos de delivery (Guo et al., 2023).

En cuanto a mejoramiento de proteínas de Cas9, se ha demostrado que la proteína SpCas9 puede mejorar su precisión reduciendo su unión al ADN no deseado. Variantes como el eSpCas9 y el SpCas9-HF1 demostraron alta actividad en los sitios deseados y redujeron significativamente los sitios fuera del objetivo. Otras estrategias, como el uso de Cas9 nickases y la exploración de homólogos de Cas9 con secuencias PAM más raras, también están siendo investigadas para mejorar la especificidad de CRISPR-Cas9 (C. Liu et al., 2017).

Por otro lado, la modificación de sgARN se utiliza para mejorar la precisión en la edición del genoma mediante ajustes en su longitud y modificaciones químicas. Estas modificaciones reducen los efectos fuera del objetivo de la nucleasa Cas9, mejorando la especificidad de la edición genómica. Sin embargo, estas estrategias están limitadas a aplicaciones que utilizan ARN sintético en lugar de transgenes basados en ADN (Cho et al., 2014). Asimismo, se puede utilizar editores de bases como ABE y CBE que permiten la edición del genoma sin DSB, reduciendo los efectos fuera del objetivo. Sin embargo, pueden generar nuevos efectos fuera del objetivo, como la edición de ARN y ADN independiente de sgRNA. Métodos como EndoV-seq y Detect-seq ayudan a detectar estos efectos. Los editores epigenéticos ofrecen otra opción para reducir efectos fuera del objetivo, aunque deben evaluarse para posibles efectos epigenéticos no deseados (Liang et al., 2019).

Por último, la modificación de los métodos de entrega como electroporación de ribonucleoproteínas (RNP) muestra una alta eficiencia en la edición del objetivo y una baja incidencia de mutaciones fuera del objetivo en comparación con otros métodos de entrega. Además, el uso de nanopartículas lipídicas (LNPs) para entregar mRNA de Cas9 y sgRNA permite una rápida degradación “*in vivo*”, lo que lo convierte en el vector más popular para la edición génica “*in vivo*” y ha llevado al desarrollo de nuevos fármacos en ensayos clínicos (Cho et al., 2014).

## 7.2 Barreras para la aplicación eficiente de CRISPR-Cas en diferentes especies de plantas

Aunque se han realizado esfuerzos considerables para secuenciar los genomas vegetales, aún persisten lagunas significativas en nuestra comprensión de la función de muchos genes el uso de CRISPR-Cas9 en plantas enfrenta un desafío crucial el cual es la identificación precisa de los genes objetivo antes de cualquier manipulación genética. Este vacío de conocimiento limita la capacidad de realizar ediciones genéticas precisas para lograr los efectos deseados en las plantas. Sin embargo, los Estudios de Asociación del Genoma (GWAS) ofrecen una esperanza prometedora al predecir con precisión las funciones de los genes. Al utilizar los resultados de GWAS, los investigadores pueden orientar sus esfuerzos hacia la manipulación genética precisa en plantas, como se ha demostrado en casos recientes, como la modulación de los niveles de antocianina en el arroz. Este enfoque permite una aplicación más efectiva de la tecnología CRISPR-Cas9 en la ingeniería genética para alcanzar resultados específicos y deseados (Cho et al., 2014).

## 7.3 Obstáculos económicos y logísticos para la adopción generalizada de cultivos editados genéticamente en la agricultura

La implementación generalizada de cultivos modificados genéticamente en la agricultura podría enfrentar desafíos tanto económicos como logísticos. La introducción de nuevas tecnologías agrícolas requiere de importantes inversiones en investigación, desarrollo y comercialización, además de enfrentar regulaciones y preocupaciones de la opinión pública. Para superar estos obstáculos, es importante promover la colaboración entre el sector público y el privado para poder respaldar políticas que fomenten la innovación y el uso responsable de la tecnología CRISPR-Cas en la agricultura (Ronald & Kliegman, 2022).

En cuanto a las regulaciones de los cultivos, estas pueden complicar la introducción de la tecnología CRISPR-Cas9 en la agricultura debido a las diferencias y varianza que puede existir entre dichas regulaciones. Además, los altos costos asociados con el desarrollo y la comercialización de estos cultivos representan un desafío significativo, ya que se necesitan grandes inversiones en investigación y desarrollo, así como en trámites regulatorios (Baumann, 2016). Por

otro lado, la aceptación pública de los cultivos editados con la tecnología CRISPR-Cas9 son temas importantes de considerar ya que, requieren de infraestructura y materiales adecuados los cuales enfrentan preocupaciones de seguridad y aceptación por parte de la sociedad (Ronald & Kliegman, 2022)

## 8. Perspectivas futuras y áreas de investigación emergentes

### 8.1 Desafíos globales

La edición de genes con CRISPR-Cas nos brinda la oportunidad de abordar retos que hoy en día afectan a la población en diversos campos, CRISPR-Cas tiene como ventajas ser una tecnología adaptable, sencilla de manejar y eficiente (Chávez-Jacobo, 2018). En algún futuro cercano se podrían estar utilizando cultivos resistentes a condiciones climatológicas extremas, sobre todo a sequías y altas temperaturas, investigadores ya están trabajando en hacer esto posible e intentando hacer cambios en cultivos importantes como el trigo, arroz y la caña de azúcar (Jiménez & Carvajal-Campos, 2021). Esto es solo el comienzo de las investigaciones basadas en la tecnología CRISPR se plantea producir plantas que puedan combatir plagas, que más personas tengan acceso a alimentos, producir compuestos terapéuticos. Se cree que pronto se puedan ver los resultados de estas investigaciones y que en los próximos años aparecerán aplicaciones cada vez más creativas de las herramientas CRISPR (Ronald & Kliegman, 2022).

### 8.2 Investigación en nuevas aplicaciones y tecnologías relacionadas con CRISPR-Cas

Durante estos últimos años se han explorado las aplicaciones que pueden dársele a la tecnología de CRISPR-Cas9. Esta promete ser una herramienta que pueda utilizarse en diversas áreas como la medicina, la agricultura, biotecnología, entre otros, para erradicar enfermedades, desarrollar cultivos más resistentes y nutritivos, etc (Morshedzadeh et al., 2024).

El CRISPR-Cas9 se ha utilizado en el tratamiento de enfermedades genéticas como fibrosis quística, la anemia de células falciformes mediante la desactivación del gen BCL11A, lo que aumenta la producción de hemoglobina fetal y en la distrofia muscular de Duchenne (W. Liu et al., 2021). Dentro del área de prevención de enfermedades, se ha utilizado CRISPR-Cas9 en ensayos para tratar enfermedades infecciosas como el VIH, tanto eliminando el genoma del virus como bloqueando su entrada en las células huésped. Además de editar el genoma, CRISPR-Cas-9 puede regular artificialmente la expresión génica activando o silenciando genes específicos, lo que tiene aplicaciones en la investigación básica y la terapia génica (Vasconcelos Komninakis et al., 2024).

Los últimos avances en la investigación sobre CRISPR-Cas9 se centran en superar los desafíos relacionados con su precisión y eficacia en la entrega. Se están explorando métodos más equitativos para evaluar cómo Cas9 se une y corta el ADN, especialmente su actividad no deseada, que aún es poco entendida. Esto incluye técnicas como la secuenciación de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP-seq) y la detección de roturas de doble cadena para mapear exhaustivamente los sitios de acción del Cas9 en el genoma (Mingarro & del Olmo, 2023). Además, se están investigando sistemas de entrega no virales y versiones más pequeñas del Cas9 para superar las limitaciones de los vectores virales tradicionales, lo que podría ampliar las aplicaciones del CRISPR-Cas9 y mejorar su precisión. Estos esfuerzos prometen no solo una mejor comprensión de la biología y la especificidad de Cas9, sino también el desarrollo de terapias génicas más efectivas y seguras (Zhu, 2022).

### 8.3 Colaboraciones interdisciplinarias entre genetistas, agrónomos, bioinformáticos y reguladores para impulsar el desarrollo responsable y sostenible de la edición de genes en agricultura

Los ingenieros agrónomos han trabajado en el desarrollo de nuevas técnicas de producción y mejora de los cultivos, incluyendo especies y semillas más resistentes a plagas y climas extremos, así como mejoradas genéticamente.

Estas mejoras contribuyen a garantizar la seguridad alimentaria y aumentar los rendimientos e ingresos de los agricultores (Ronald & Kliegman, 2022). Tanto genetistas como bioinformáticos se dedican estudiar la genética de los cultivos y analizar los datos genómicos. Esta colaboración permite identificar genes de interés, comprender su función y desarrollar estrategias de edición genética para mejorar las características de los cultivos, como su resistencia a enfermedades o su adaptación a diferentes condiciones ambientales (Zhou et al., 2023).

## 9. Conclusiones

CRISPR-Cas ha emergido como una técnica prometedora para la investigación vegetal básica y aplicada. La complementación de la Biotecnología vegetal con la técnica CRISPR-Cas ha permitido un avance significativo en el ámbito agrícola, las aplicaciones potenciales y las ya existentes son numerosas. El crecimiento evidente de la población requiere de cosechas prolíficas que se logren aun en las adversidades que traen consigo las regiones con climas complicados y el acelerado cambio climático, es por ello por lo que el uso de estas tecnologías en nuestro criterio es necesario, sin embargo, consideramos que un equilibrio con el ambiente sería lo apropiado, evaluar sin sesgo cuál es el límite en el que se puede avanzar sin comprometer nuestro entorno, sería la sinergia ideal.

La comunidad científica y empresarial debe apearse con conciencia a las regulaciones morales y éticas para que los avances realizados sean seguros para el humano y para el ambiente, es necesario hacer a un lado los intereses económicos que representa el uso de esta tecnología y priorizar el bienestar humano, así como su entorno. Sin duda, el uso de CRISPR-Cas en la agricultura se necesita y representaría un hito del siglo XXI siempre y cuando se realice con conciencia, viendo objetivamente en favor de la población y del ambiente, deberá estudiarse con cautela si un producto proveniente de edición génica es nocivo para la población o el ambiente, si afecta a alguno de estos no puede utilizarse.

## 10. Perspectivas a futuro

CRISPR-Cas9 se ha convertido en una herramienta muy importante para la edición genética en diversas áreas, desde la medicina, hasta la agricultura. En cuanto al área médica, esta tecnología ofrece la posibilidad de generar tratamientos más precisos y personalizados para una diversidad de enfermedades genéticas, infecciosas o incluso para el cáncer. Por otro lado, si se utiliza CRISPR-Cas9 en la agricultura, este puede revolucionar la producción de alimentos al permitir la creación de cultivos con una alta resistencia a enfermedades, a temperaturas y condiciones climáticas extremas y con un alto valor nutricional. Pudiéndose reflejar como un aumento en la seguridad alimentaria, reduciendo así la dependencia a pesticidas y fertilizantes.

Asimismo, en el ámbito de la biotecnología, se anticipan avances significativos con la capacidad de diseñar organismos modificados genéticamente para aplicaciones industriales y ambientales, como la producción de biocombustibles, la biorremediación y la síntesis de compuestos farmacéuticos. Sin embargo, estos avances también plantean desafíos éticos y regulatorios importantes que deben abordarse de manera cuidadosa y deliberada. Es crucial garantizar que el uso de CRISPR-Cas9 sea responsable y equitativo, protegiendo la seguridad y los derechos de las personas y el medio ambiente, al tiempo que se fomenta la innovación y el progreso científico.

## 11. Declaración de ética

Los autores respaldan plenamente este trabajo y han contribuido de manera significativa que justifica su autoría. No existe conflicto de interés y se han seguido todos los procedimientos éticos y requisitos necesarios.

## 12. Abreviaturas

**ADN:** ácido desoxirribonucleico; **ALS:** enzima acetato sintasa; **CRISPR-Cas:** repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas; **crARN:** ARN cortos de CRISPR; **DBS:** reparación de la ruptura de la doble

cadena de ADN; **tracrARN**: ARN CRISPR transactivante; **gARN**: ARN guía; **LOGL5**: citoquinina ribósido 5'-monofosfato fosforribohidrolasa; **Nt**: nucleótidos; **NHEJ**: unión de extremos no homólogos; **RH**: reparación homóloga; **PAM**: motivo adyacente de proto espaciador; **Quizalofop**: herbicida fenoxi selectivo de postemergencia, empleado para controlar las malas hierbas anuales y perennes; **OGM**: organismos genéticamente modificados; **RNP**: complejo de ribonucleoproteína.

### 13. Referencias bibliográficas

- Allemailem, K.S., Almatroodi, S.A., Almatroudi, A., Alrumaihi, F., Al Abdulmonem, W., Al-Megrin, W.A.I., Aljamaan, A.N., Rahmani, A.H., & Khan, A.A. (2023). Recent Advances in Genome-Editing Technology with CRISPR/Cas9 Variants and Stimuli-Responsive Targeting Approaches within Tumor Cells: A Future Perspective of Cancer Management. *Int. J. Mol. Sci.* 24(8), 7052. <https://doi.org/10.3390/ijms24087052>
- Alok, A., Sandhya, D., Jogam, P., Rodrigues, V., Bhati, K.K., Sharma, H., & Kumar, J. (2020). The Rise of the CRISPR/Cpf1 System for Efficient Genome Editing in Plants. *Front Plant Sci.* 11, 264. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00264>
- Aparicio-Moreno, R. (2021). Aplicaciones de la tecnología CRISPR-Cas en agricultura y biotecnología vegetal. Tesis, TFM. Universidad de Almería. <https://repositorio.ual.es/bitstream/handle/10835/13722/APARICIO%20MORENO,%20RAFAEL.pdf?sequence=1>
- Bao, A., Burritt, D.J., Chen, H., Zhou, X., Cao, D., & Tran, L.-S.P. (2019). The CRISPR/Cas9 system and its applications in crop genome editing. *Crit Rev Biotechnol.* 39(3), 321–336. <https://doi.org/10.1080/07388551.2018.1554621>
- Baranov, D., Dolgov, S., & Timerbaev, V. (2024). New Advances in the Study of Regulation of Tomato Flowering-Related Genes Using Biotechnological Approaches. *Plants*, 13(3), 359. <https://doi.org/10.3390/plants13030359>
- Barrangou, R. (2013). CRISPR-Cas systems and RNA-guided interference. *WIREs RNA*, 4(3), 267–278. <https://doi.org/10.1002/wrna.1159>
- Bartkowski, B., Theesfeld, I., Pirscher F., Timaeus J. (2018). Snipping around for food: economic, ethical and policy implications of CRISPR/Cas genome editing. *Geoforum*, 96, 172–180. <https://doi.org/10.1016/j.geoforum.2018.07.017>
- Baumann, M. (2016). CRISPR/Cas9 genome editing – new and old ethical issues arising from a revolutionary technology. *NanoEthics*, 10(2), 139–159. <https://doi.org/10.1007/s11569-016-0259-0>
- Bhattacharya, S., & Satpati, P. (2023). Insights into the Mechanism of CRISPR/Cas9-Based Genome Editing from Molecular Dynamics Simulations. *ACS Omega*, 8(2), 1817–1837. <https://doi.org/10.1021/acsomega.2c05583>
- Blanchard, N., Salvioni, A., & Robey, E.A. (2020). Chapter 26 - Adaptive immunity. *Toxoplasma gondii* The Model Apicomplexan - Perspectives and Methods. Third Edition, (pp. 1107–1146). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815041-2.00026-8>
- Butt, H., Eid, A., Momin, A.A., Bazin, J., Crespi, M., Arold, S.T., & Mahfouz, M.M. (2019). CRISPR directed evolution of the spliceosome for resistance to splicing inhibitors. *Genome Biol.* 20(1). <https://doi.org/10.1186/s13059-019-1680-9>
- Casquier, J., & Ortiz, R. (2012). Las semillas transgénicas: ¿un debate bioético?. *Derecho PUCP*, 69(1), 281–300. <https://doi.org/10.18800/derechopucp.201202.014>
- Chávez-Jacobo, V.M. (2018). El sistema de Edición genética CRISPR/Cas y su uso como antimicrobiano específico. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 21(2), 116–123. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2018.2.5>
- Cho, S. W., Kim, S., Kim, Y., et al. (2014). Analysis of off-target effects of CRISPR/Cas-derived RNA-guided endonucleases and nickases. *Genome Res.* 24(1), 132–141. <https://doi.org/10.1101/gr.162339.113>
- Ellison, E.E., Nagalakshmi, U., Gamou, M.E., Huang, P. jui, Dinesh-Kumar, S., & Voytas, D.F. (2020). Multiplexed heritable gene editing using RNA viruses and mobile single guide RNAs. *Nat Plants*. 6(6), 620–624. <https://doi.org/10.1038/s41477-020-0670-y>

- Feng, S., Wang, Z., Li, A., Xie, X., Liu, J., Li, S., Li, Y., Wang, B., Hu, L., Yang, L., & Guo, T. (2022). Strategies for High-Efficiency Mutation Using the CRISPR/Cas System. *Front. Cell Dev. Biol.* 9, 803252. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.803252>
- Fernanda Lammoglia-Cobo, M., Lozano-Reyes, R., Daniel García-Sandoval, C., Michelle Avilez-Bahena, C., Trejo-Revales, V., Balam Muñoz-Soto, R., & López-Camacho, C. The revolution in genetic engineering: CRISPR/Cas system. *Investigación en Discapacidad*, 5(2), 116-128.
- Ferreira, S.S., & Reis, R.S. (2023). Using CRISPR/Cas to enhance gene expression for crop trait improvement by editing miRNA targets. *Journal of Experimental Botany*, 74(7), 2208–2212. <https://doi.org/10.1093/jxb/erad003>
- Fineran, P.C., & Charpentier, E. (2012). Memory of viral infections by CRISPR-Cas adaptive immune systems: Acquisition of new information. *Virology*, 434(2), 202–209. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2012.10.003>
- Guo, C., Ma, X., Gao, F., & Guo, Y. (2023). Off-target effects in CRISPR/Cas9 gene editing. *Front. Bioen. Biotechnol.* 11, 1143157. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2023.1143157>
- Herrera-Cabrera, B., Salgado-Garciglia, R., López-Valdez, L., Reyes, C., Montiel-Montoya, J., Martínez, F., Lucho-Consantano, G., & Barrales-Cureño, H. (2021). Edición genómica con CRISPR/Cas9: Premio Nobel de Química 2020. *Revista de Química*, 35(1), 22–30. <https://revistas.pucp.edu.pe/index.php/quimica/article/view/23324>
- Hillary, V.E., & Ceasar, S.A. (2023). A Review on the Mechanism and Applications of CRISPR/Cas9/Cas12/Cas13/Cas14 Proteins Utilized for Genome Engineering. *Mol Biotechnol.* 65(3), 311–325. <https://doi.org/10.1007/s12033-022-00567-0>
- Hsu, P.D., Scott, D.A., Weinstein, J. A., Ran, F.A., Konermann, S., Agarwala, V., Li, Y., Fine, E.J., Wu, X., Shalem, O., Cradick, T.J., Marraffini, L.A., Bao, G., & Zhang, F. (2013). DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nat Biotechnol.* 31(9), 827–832. <https://doi.org/10.1038/nbt.2647>
- Huang-Holger-Puchta, T.K., Schillberg, S., Huang-Á-Puchta, T.H., & Orzaez, D. (2021). Novel CRISPR/Cas applications in plants: from prime editing to chromosome engineering. *Transgenic Res.* 30(4), 529–549. <https://doi.org/10.1007/S11248-021-00238-X>
- Huang, Z., Fang, J., Zhou, M., Gong, Z., & Xiang, T. (2022). CRISPR-Cas13: A new technology for the rapid detection of pathogenic microorganisms. *Front. Microbiol.* 13, 1011399. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1011399>
- Hummel, A.W., Chauhan, R.D., Cermak, T., Mutka, A.M., Vijayaraghavan, A., Boyher, A., Starker, C.G., Bart, R., Voytas, D.F., & Taylor, N.J. (2018). Allele exchange at the EPSPS locus confers glyphosate tolerance in cassava. *Plant Biotechnol J.* 16(7), 1275-1282. <https://doi.org/10.1111/pbi.12868>
- Iáñez-Pareja, E. (2016). *Plantas transgénicas: aspectos éticos y sociales “El debate social sobre los transgénicos”*. 1-21. [https://ipaz.ugr.es/wp-content/files/miradasalmundo/sesion40/Plantas\\_transgenicas-Aspectos\\_eticos\\_y\\_sociales.pdf](https://ipaz.ugr.es/wp-content/files/miradasalmundo/sesion40/Plantas_transgenicas-Aspectos_eticos_y_sociales.pdf)
- Jiménez, V.M., & Carvajal-Campos, P. (2021). Ingeniería genética contra estrés abiótico en cultivos neotropicales: osmositos, factores de transcripción y CRISPR/Cas9. *Rev. Colomb. Biotechnol.* 23(2), 47–66. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v23n2.88487>
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J.A., & Charpentier, E. (2012). A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science*, 337(6096), 816–821. <https://doi.org/10.1126/science.1225829>
- Jogam, P., Sandhya, D., Alok, A., Peddaboina, V., Allini, V.R., & Zhang, B. (2022). A review on CRISPR/Cas-based epigenetic regulation in plants. *Int J Biol Macromol.* 219, 1261–1271. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.08.182>
- Karavolias, N.G., Horner, W., Abugu, M.N., & Evanega, S.N. (2021). Application of Gene Editing for Climate Change in Agriculture. *Front. Sustain. Food Syst.* 5, 685801. <https://doi.org/10.3389/FSUFS.2021.685801>

- Karavolias, N. (2022). CRISPR en agricultura: 2022 en revisión. Innovative Genomics Institute (IGI). <https://innovativegenomics.org/es/noticias/agricultura-n%C3%ADtida-2022/>
- Kawakami, E., Oosterhuis, D., & Snider, J. (2013). High Temperature and the Ethylene Antagonist 1-Methylcyclopropane Alter Ethylene Evolution Patterns, Antioxidant Responses, and Boll Growth in *Gossypium hirsutum*. *AJPS*, 4(7), 1400-1408. [https://www.scirp.org/html/10-2600834\\_33999.htm](https://www.scirp.org/html/10-2600834_33999.htm)
- Kuang, Y., Li, S., Ren, B., Yan, F., Spetz, C., Li, X., Zhou, X., & Zhou, H. (2020). Base-Editing-Mediated Artificial Evolution of *OsALS1* In Planta to Develop Novel Herbicide-Tolerant Rice Germplasms. *Mol. Plant*. 13(4), 565-572. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2020.01.010>
- Lee, J. E., Neumann, M., Duro, D. I., & Schmid, M. (2019). CRISPR-based tools for targeted transcriptional and epigenetic regulation in plants. *PLoS ONE*, 14(9), e0222778. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222778>
- Liang, P., Xie, X., Zhi, S., Sun, H., Zhang, X., Chen, Y., Chen, Y., Xiong, Y., Ma, W., Liu, D., Huang, J., & Songyang, Z. (2019). Genome-wide profiling of adenine base editor specificity by EndoV-seq. *Nat Commun*. 10(1). <https://doi.org/10.1038/S41467-018-07988-z>
- Liu, C., Li, X., Meng, D., Zhong, Y., Chen, C., Dong, X., Xu, X., Chen, B., Li, W., Li, L., Tian, X., Zhao, H., Song, W., Luo, H., Zhang, Q., Lai, J., Jin, W., Yan, J., & Chen, S. (2017). A 4-bp Insertion at *ZmPLA1* Encoding a Putative Phospholipase A Generates Haploid Induction in Maize. *Mol. Plant*. 10(3), 520-522. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2017.01.011>
- Liu, C., Zhong, Y., Qi, X., et al. (2020). Extension of the *in vivo* haploid induction system from diploid maize to hexaploid wheat. *Plant Biotechnol J*. 18(2), 316–318. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6953200/>
- Liu, W., Li, L., Jiang, J., Wu, M., & Lin, P. (2021). Applications and challenges of CRISPR-Cas gene-editing to disease treatment in clinics. *Precis Clin Med*. 4(3), 179–191. <https://doi.org/10.1093/pccmedi/pbab014>
- Lu, K., Wu, B., Wang, J., Zhu, W., Nie, H., Qian, J., Huang, W., & Fang, Z. (2018). Blocking amino acid transporter *OsAAP3* improves grain yield by promoting outgrowth buds and increasing tiller number in rice. *Plant Biotechnol J*. 16(10), 1710–1722. <https://doi.org/10.1111/pbi.12907>
- Maher, M.F., Nasti, R. A., Vollbrecht, M., Starker, C.G., Clark, M. D., & Voytas, D. F. (2019). Plant gene editing through de novo induction of meristems. *Nat Biotechnol*. 38(1), 84–89. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0337-2>
- Manghwar, H., Lindsey, K., Zhang, X., & Jin, S. (2019). CRISPR/Cas System: Recent Advances and Future Prospects for Genome Editing. *Trends Plant Sci*. 24(12), 1102–1125. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2019.09.006>
- Mattiello, L., Rütgers, M., Sua-Rojas, M.F., Tavares, R., Soares, J.S., Begcy, K., & Menossi, M. (2022). Molecular and Computational Strategies to Increase the Efficiency of CRISPR-Based Techniques. *Front. Plant Sci*. 13, 868027. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.868027>
- Mehta, D., Stürchler, A., Anjanappa, R.B., Shan-e-Ali Zaidi, S., Hirsch-Hoffmann, M., Gruissem, W., & Vanderschuren, H. (2019). Linking CRISPR-Cas9 interference in cassava to the evolution of editing-resistant geminiviruses. *Genome Biol*. 20(1), 80. <https://doi.org/10.1186/s13059-019-1678-3>
- Mendoza-Télez, B., Zamora-Bello, A., Rosas-Paz, M., Villarreal-Huerta, D., De la Fuente, I., Segal-Kischinevzky, C., & González, J. (2022). Introducción a los sistemas CRISPR y sus aplicaciones en levaduras. *TIP Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*, 25, e502. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2022.502>
- Mingarro, G., & Del Olmo, M.L. (2023). Improvements in the genetic editing technologies: CRISPR-Cas and beyond. *Gene*, 852, 147064. <https://doi.org/10.1016/J.GENE.2022.147064>
- Mohr, S.E., Hu, Y., Ewen-Campen, B., Housden, B.E., Viswanatha, R., & Perrimon, N. (2016). CRISPR guide RNA design for research applications. *FEBS J*. 283(17), 3232–3238. <https://doi.org/10.1111/febs.13777>

- Morshedzadeh, F., Ghanei, M., Lotfi, M., Ghasemi, M., Ahmadi, M., Najari-Hanjani, P., Sharif, S., Mozaffari-Jovin, S., Peymani, M., & Abbaszadegan, M.R. (2024). An Update on the Application of CRISPR Technology in Clinical Practice. *Mol Biotechnol.* 66(2), 179–197. <https://doi.org/10.1007/s12033-023-00724-z>
- Nozawa, T., Furukawa, N., Aikawa, C., Watanabe, T., Haobam, B., Kurokawa, K., Maruyama, F., & Nakagawa, I. (2011). CRISPR Inhibition of Prophage Acquisition in *Streptococcus pyogenes*. *PLoS ONE*, 6(5), e19543. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019543>
- Palmgren, M.G., Edenbrandt, A.K., Vedel, S.E., et al. (2015). Are we ready for back-to-nature crop breeding?. *Trends Plant Sci.* 20(3), 155–164. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2014.11.003>
- de Pater, S., Klemann, B.J.P.M., & Hooykaas, P.J.J. (2018). True gene-targeting events by CRISPR/Cas-induced DSB repair of the PPO locus with an ectopically integrated repair template. *Sci Rep.* 8(1), 3338. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21697-z>
- Pausch, P., Al-Shayeb, B., Bisom-Rapp, E., et al. (2020). Crispr-Cas $\Phi$  from huge phages is a hypercompact genome editor. *Science*, 369(6501), 333–337. <https://doi.org/10.1126/science.abb1400>
- Pickar-Oliver, A., & Gersbach, C.A. (2019). The next generation of CRISPR–Cas technologies and applications. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 20(8), 490–507. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0131-5>
- Powles, S.B., & Yu, Q. (2010). Evolution in action: plants resistant to herbicides. *Annu Rev Plant Biol.* 61, 317–347. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042809-112119>
- Qi, Q., Hu, B., Jiang, W., et al. (2023). Advances in Plant Epigenome Editing Research and Its Application in Plants. *Int J Mol Sci.* 24(4), 3442. <https://doi.org/10.3390/ijms24043442>
- Rath, D., Amlinger, L., Rath, A., & Lundgren, M. (2015). The CRISPR-Cas immune system: Biology, mechanisms and applications. *Biochimie*, 117, 119–128. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2015.03.025>
- Rath, J. (2018). Safety and Security Risks of CRISPR/Cas9. In: Schroeder, D., Cook, J., Hirsch, F., Fenet, S., Muthuswamy, V. (eds) Ethics Dumping. SpringerBriefs in Research and Innovation Governance. Springer, Cham. (pp. 107–113). [https://doi.org/10.1007/978-3-319-64731-9\\_13](https://doi.org/10.1007/978-3-319-64731-9_13)
- Ronald, P., & Kliegman, M. (2022). *CRISPR en agricultura*. Hochstrasser et al. (Eds.) CRISPRpedia. Berkeley: Instituto de Genómica Innovadora, Universidad de California, Berkeley. <https://innovativegenomics.org/crisprpedia/crispr-in-agriculture/>
- Safari, F., Zare, K., Negahdaripour, M., Barekati-Mowahed, M., & Ghasemi, Y. (2019). CRISPR Cpf1 proteins: Structure, function and implications for genome editing. *Cell Biosci.* 9, 36. <https://doi.org/10.1186/s13578-019-0298-7>
- Sánchez-Artigas, R., Díaz-Armas, M.T., Rodríguez-Duque, R., & Miguel-Soca, P.E. (2021). Principles and medical applications of gene editing by CRISPR/Cas. *Medisur*, 19(6), 1005-1014. [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1727-897X2021000601005&lng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1727-897X2021000601005&lng=es)
- Shi, J., Gao H., Wang H., et al. (2017). ARGOS8 variants generated by CRISPR-Cas9 improve maize grain yield under field drought stress conditions. *Plant Biotechnol J.* 15(2), 207–216. <https://doi.org/10.1111/pbi.12603>
- Steinert, J., Schiml, S., & Puchta, H. (2016). Homology-based double-strand break-induced genome engineering in plants. *Plant Cell Rep.* 35(7), 1429–1438. <https://doi.org/10.1007/S00299-016-1981-3>
- Tafurt-Cardona, Y. & Marin-Morales, M.A. (2014). Principales mecanismos de reparación de daños en la molécula de ADN. *Biosalud*, 13(2), 95-110. <https://revistasojs.ucaldas.edu.co/index.php/biosalud/article/view/4676/4267>
- Tyumentseva, M., Tyumentsev, A., & Akimkin, V. (2023). CRISPR/Cas9 Landscape: Current State and Future Perspectives. *Int. J. Mol. Sci.* 24(22), 16077. <https://doi.org/10.3390/ijms242216077>

- Vasconcelos-Komninakis, S., Domingues, W., Saeed-Sanabani, S., Angelo-Folgosi, V., Neves-Barbosa, I., & Casseb, J. (2024). CRISPR/CAS as a Powerful Tool for Human Immunodeficiency Virus Cure: A Review. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 40(6), 363–375. <https://doi.org/10.1089/AID.2022.0148>
- Waltz, E. (2018). With a free pass, CRISPR-edited plants reach market in record time. *Nat Biotechnol*. 36(1), 6–8. <https://doi.org/10.1038/nbt0118-6b>
- Wang, C., Wang, G., Gao, Y., et al. (2020). A cytokinin-activation enzyme-like gene improves grain yield under various field conditions in rice. *Plant Mol Biol*. 102(4–5), 373–388. <https://doi.org/10.1007/S11103-019-00952-5>
- Wang, Q., Zhang, D., Dai, Y.R., & Liu, C.C. (2024). Efficient tobacco rattle virus-induced gene editing in tomato mediated by the CRISPR/Cas9 system. *Biotechnol J*. 19(5), e2400204. <https://doi.org/10.1002/biot.202400204>
- Yamamoto, T., Kashojiya, S., Kamimura, S., et al. (2018). Application and development of genome editing technologies to the Solanaceae plants. *Plant Physiol Biochem*. 131, 37–46. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2018.02.019>
- Yang, H., & Patel, D.J. (2019). CasX: a new and small CRISPR gene-editing protein. *Cell Res*. 29(5), 345–346. <https://doi.org/10.1038/s41422-019-0165-4>
- Zeng, Y., Wen, J., Zhao, W., Wang, Q., & Huang, W. (2020). Rational Improvement of Rice Yield and Cold Tolerance by Editing the Three Genes *OsPIN5b*, *GS3*, and *OsMYB30* With the CRISPR–Cas9 System. *Front Plant Sci*. 10, 1663. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2019.01663>
- Zhang, F. (2019). Development of CRISPR-Cas systems for genome editing and beyond. *Q. Rev. Biophys*. 52,e6. <https://doi.org/10.1017/s0033583519000052>
- Zhang, F., Wen, Y., & Guo, X. (2014). CRISPR/Cas9 for genome editing: Progress, implications and challenges. *Hum Mol Genet*. 23(R1), 40–46. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddu125>
- Zhang, H., Si, X., Ji, X., Fan, R., Liu, J., Chen, K., Wang, D., & Gao, C. (2018). Genome editing of upstream open reading frames enables translational control in plants. *Nat Biotechnol*. 36(9), 894–898. <https://doi.org/10.1038/nbt.4202>
- Zhang, Y., Bai, Y., Wu, G., Zou, S., Chen, Y., Gao, C., & Tang, D. (2017). Simultaneous modification of three homoeologs of *TaEDR1* by genome editing enhances powdery mildew resistance in wheat. *Plant J*. 91(4), 714–724. <https://doi.org/10.1111/tpj.13599>
- Zhang, Z., Hua, L., Gupta, A., Tricoli, D., Edwards, K. J., Yang, B., & Li, W. (2019). Development of an *Agrobacterium*-delivered CRISPR/Cas9 system for wheat genome editing. *Plant Biotechnol J*. 17(8), 1623–1635. <https://doi.org/10.1111/pbi.13088>
- Zhou, J., Luan, X., Liu, Y., Wang, L., Wang, J., Yang, S., Liu, S., Zhang, J., Liu, H., & Yao, D. (2023). Strategies and Methods for Improving the Efficiency of CRISPR/Cas9 Gene Editing in Plant Molecular Breeding. *Plants*, 12(7), 1478. <https://doi.org/10.3390/plants12071478>
- Zhou, J., Xin, X., He, Y., et al. (2019). Multiplex QTL editing of grain-related genes improves yield in elite rice varieties. *Plant Cell Rep*. 38(4), 475–485. <https://doi.org/10.1007/S00299-018-2340-3>
- Zhu, Y. (2022). Advances in CRISPR/Cas9. *Biomed Res Int*. 2022, 9978571. <https://doi.org/10.1155/2022/9978571>

**Descargo de responsabilidad/Nota del editor:** Las declaraciones, opiniones y datos contenidos en todas las publicaciones son responsabilidad exclusiva de los autores y colaboradores individuales y no de SAV y/o el/lo editor/es declinan toda responsabilidad por daños personales o materiales derivados de ideas, métodos, instrucciones o productos a los que se haga referencia en el contenido.

**Cita:** Elizondo-Luevano, J. H., García-Sotelo, L. A., Cárdenas-Paredes, I. E., de Dios-Romero, V., Villanueva-Terán, C. y Kačániová, M. (2024) «Edición de Genes y CRISPR-Cas: Aplicaciones, Avances y Desafíos: Genes y CRISPR», *Scientia Agricolis Vita*, 1(2), pp. 24–44. <https://agricolis.uanl.mx/index.php/revista/articulo/view/11>

Editor Académico: Guadalupe Gutiérrez -Soto

Recibido: fecha

Revisado: fecha

Aceptado: fecha

Publicado: 31-05-2024



**Copyright:** © 2024 por los autores. Presentado para su posible publicación en acceso abierto bajo los términos y condiciones de la licencia Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).