

# SISTEMA CRISPR COMO HERRAMIENTA TRANSFORMADORA EN LA MEDICINA MODERNA: APORTES, DESAFÍOS Y LÍMITES BIOÉTICOS

## CRISPR SYSTEM AS A TRANSFORMATIVE TOOL IN MODERN MEDICINE: CONTRIBUTIONS, CHALLENGES, AND BIOETHICAL LIMITS

Lic. Mayda Carrasco Alfonso (0000-0001-8922-4585), Universidad de Matanzas

[mayda.carrasco@umcc.cu](mailto:mayda.carrasco@umcc.cu)

### Resumen

El sistema de Repeticiones Palindrómicas Cortas Agrupadas y Regularmente Interespaciadas, constituye una herramienta revolucionaria en la edición genética. Su aplicabilidad se ha expandido desde la edición de líneas celulares *in vitro* hasta la modificación genética de organismos completos. Este trabajo tiene como objetivo revisar la literatura reciente sobre su aplicación en medicina, destacando sus ventajas técnicas, sus principales limitaciones y los dilemas éticos que plantea. Se resumen resultados de estudios preclínicos y ensayos clínicos en enfermedades como la anemia de células falciformes, determinados cánceres y enfermedades infecciosas de difícil erradicación, en los que se ha logrado corregir mutaciones causales y modular la expresión génica. Sin embargo, la introducción del sistema en medicina enfrenta desafíos técnicos y éticos, dado que la edición *in vivo* plantea riesgos de toxicidad, efectos fuera del objetivo y respuestas inmunes. Pese a sus desafíos, esta tecnología se perfila como una herramienta clave en la biomedicina contemporánea.

**Palabras claves:** *bioética, biomedicina, ensayos clínicos, mutaciones genéticas, terapias avanzadas, tecnología genómica*

### Summary

*The system of Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats constitutes a revolutionary tool in genetic editing. Its applicability has expanded from the modification of cell lines in vitro to the*



---

Monografías 2025  
Universidad de Matanzas © 2025  
ISBN978-959-7246-01-5:

*genetic alteration of whole organisms. This work aims to review recent literature on its application in medicine, highlighting its technical advantages, its main limitations, and the ethical dilemmas it raises. Results from preclinical studies and clinical trials are summarized in diseases such as sickle cell disease, certain types of cancer, and difficult-to-eradicate infectious diseases, in which causal mutations have been corrected and gene expression has been modulated. However, the introduction of this system into medicine faces technical and ethical challenges, as in vivo genome editing poses risks of toxicity, off-target effects, and immune responses. Despite these challenges, this technology is emerging as a key tool in contemporary biomedicine.*

**Keywords:** *bioethics, biomedicine, clinical trials, genetic mutations, advanced therapies, genomic technology*

---

La edición del genoma ha experimentado un progreso sin precedentes en las últimas décadas gracias al desarrollo de metodologías capaces de modificar secuencias genéticas con gran precisión y eficiencia. Esta transformación de los procedimientos se explica mediante la transición desde técnicas de modificación genética imprecisas e intrincadas, como la mutagénesis aleatoria o la inserción inespecífica de transgenes (Baum *et al.*, 2006; Chauhan *et al.*, 2020; Krämer *et al.*, 2010), a plataformas de edición dirigidas con base en la interacción específica entre proteínas y secuencias de ADN (Lu *et al.*, 2020; Wan *et al.*, 2020). Primero, gracias al desarrollo de las nucleasas de dedos de zinc así como de las nucleasas tipo TALEN se permitió introducir rupturas de doble cadena en regiones concretas del genoma, aunque su diseño y construcción resultaban complejos e igualmente costosos (Lessard *et al.*, 2024; Zubair *et al.*, 2025). Después, la irrupción de sistemas más específicos simplificó este proceso de manera radical, gracias a que la especificidad se determina principalmente por la secuencia de un ARN guía que es fácilmente programable. De manera similar, el avance en las técnicas de secuenciación masiva, la caracterización total de genomas completos, así como una comprensión más profunda sobre las vías de reparación del ADN han permitido que se optimicen las condiciones experimentales (Abdi *et al.*, 2024), para evaluar con rigor mayor la seguridad de las intervenciones. En esta situación se puede alterar de manera dirigida genes individuales, redes reguladoras completas e incluso corregir variantes patogénicas específicas, además de la rapidez y eficiencia que eran impensables hace solo dos décadas.

Entre estas herramientas de edición genética, el sistema de Repeticiones Palindrómicas Cortas Agrupadas y Regularmente Interespaciadas, conocido mundialmente por sus siglas en inglés CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*), se ha consolidado como la tecnología que ha revolucionado la biología molecular moderna (Barrangou, 2015; Ghosh & Chatterjee, 2024). Su capacidad para dirigir cortes específicos en el ADN, combinada con la programación sencilla mediante secuencias guía, ha permitido intervenir el genoma de prácticamente cualquier organismo con una facilidad nunca alcanzada. Este avance ha transformado no solo la investigación básica, sino también el horizonte de las terapias génicas, la ingeniería de organismos modelo, la biotecnología agrícola y la medicina personalizada.

El sistema CRISPR fue identificado inicialmente de manera casi accidental, a partir de observaciones genómicas que en un principio carecían de explicación funcional clara. A finales de la década de 1980, investigadores que analizaban el genoma de *Escherichia coli* describieron la presencia de secuencias repetitivas cortas, separadas por fragmentos variables que no guardaban relación aparente entre sí, pero estos hallazgos se interpretaron como curiosidades genómicas sin relevancia (Ishino *et al.*, 1987; Rawat *et al.*, 2021). Durante los años 90 y comienzos de los 2000, estudios comparativos en bacterias y arqueas, incluidos los pioneros de Francisco Mojica, revelaron que dichas repeticiones, posteriormente denominadas Repeticiones Palindrómicas Cortas Agrupadas y Regularmente Interespaciadas, nombre que daría origen al acrónimo CRISPR, se encontraban ampliamente distribuidas en distintos microorganismos, lo que sugería una función conservada (Mojica *et al.* 2016 a y b). El avance clave se produjo cuando se comprobó que muchos de los espaciadores coincidían con secuencias de fagos y plásmidos, lo que llevó a proponer que estos loci actuaban como un registro molecular de infecciones previas.

En 2007, experimentos realizados en *Streptococcus thermophilus* demostraron de forma directa que la incorporación de nuevos espaciadores derivados de virus confería resistencia específica frente a esos mismos fagos, lo que confirmó que se trataba de un sistema inmunitario adaptativo (Marraffini 2015; Pennisi 2013). Paralelamente, se identificaron y caracterizaron las proteínas asociadas Cas, responsables del procesamiento del ARN derivado del locus CRISPR y de la degradación del material genético invasor (Jansen *et al.*, 2002). La combinación de estudios bioinformáticos, genéticos y bioquímicos permitió así reconstruir, paso a paso, el funcionamiento de este mecanismo defensivo, preparando el terreno para que, pocos años después, se reconociera su enorme potencial como herramienta programable de edición del genoma en organismos muy alejados de su contexto bacteriano original.

El sistema CRISPR-Cas se sustenta en la organización particular de un locus genómico característico que integra tres elementos principales: las repeticiones palindrómicas cortas regularmente interespaciadas, los espaciadores y los genes cas (CRISPR-associated) (Ganger *et al.*, 2023; Mohamadi *et al.*, 2020). Las repeticiones son secuencias cortas de secuencia variable, altamente conservadas dentro de una especie, dispuestas en tándem y separadas por espaciadores de longitud

similar. Estos espaciadores corresponden, en muchos casos, a fragmentos de ADN de fagos o plásmidos que han infectado previamente a la bacteria o arquea, y constituyen un auténtico “registro molecular” de exposiciones anteriores. Contiguos a esta región se localizan los genes *cas*, que codifican proteínas con funciones nucleasa, helicasa, de unión a ácidos nucleicos o de procesamiento de ARN, y que conforman la maquinaria efectora del sistema inmunitario adaptativo microbiano.

Desde el punto de vista funcional, el sistema CRISPR-Cas se divide en tres etapas: adquisición, expresión e interferencia. En la fase de adquisición, fragmentos de material genético invasor son capturados e integrados como nuevos espaciadores en el extremo proximal del locus, lo que actualiza la memoria inmunológica de la célula. En la fase de expresión, el locus CRISPR se transcribe como un ARN largo precursor (pre-crARN), que posteriormente es procesado en múltiples crARN (CRISPR RNA) individuales, cada uno conteniendo la secuencia de un espaciador y parte de la repetición. Estos crARN se ensamblan con proteínas Cas específicas (como Cas9, Cas12a u otras, dependiendo del tipo de sistema) y, en algunos casos, con un ARN adicional (tracrRNA en el sistema tipo II), formando complejos ribonucleoproteicos capaces de reconocer secuencias complementarias en el ADN o ARN invasor (Khan *et al.*, 2022).

El reconocimiento y la actividad efectora se basan en la complementariedad entre el crARN y la secuencia diana, así como en la presencia de un motivo adyacente al protoespaciador (PAM, por sus siglas en inglés) en el material genético objetivo. En el sistema CRISPR-Cas9 de *Streptococcus pyogenes*, por ejemplo, la proteína Cas9 utiliza un ARN guía (sgARN) que fusiona crARN y tracrARN en una sola molécula sintética, y requiere la presencia de un PAM del tipo NGG para un anclaje inicial estable al ADN. Una vez formado el complejo ADN-ARN-proteína, se induce una ruptura de doble cadena en una posición precisa relativa al PAM, mediada por los dominios nucleasa HNH y RuvC de Cas9 (Tang *et al.*, 2021). En células eucariotas, esta ruptura activa las vías endógenas de reparación del ADN, principalmente la unión de extremos no homólogos (NHEJ) o la reparación dirigida por homología (HDR), lo que permite, respectivamente, generar mutaciones de cambio de marco o introducir modificaciones específicas cuando se proporciona una plantilla donadora. Este principio bioquímico es la base de la enorme versatilidad del sistema CRISPR-Cas como herramienta de edición genética (Yang *et al.*, 2020).

Las aplicaciones experimentales del sistema CRISPR se han extendido, en primera instancia, al ámbito de la edición genética en líneas celulares cultivadas. En este contexto, CRISPR-Cas se utiliza para generar mutaciones dirigidas mediante la inducción de rupturas de doble cadena en genes específicos, lo que permite inactivar su función por introducción de inserciones o deleciones y corregir variantes patogénicas cuando se aporta una plantilla de reparación adecuada (Liu *et al.*, 2023). Estas aproximaciones han sido fundamentales para estudiar la función génica, modelar enfermedades humanas en células derivadas de pacientes y evaluar la repercusión de mutaciones específicas sobre rutas de señalización, proliferación, diferenciación celular o respuesta a fármacos. Además, el uso de bibliotecas de ARN guía en formato de cribado a gran escala ha permitido realizar pantallas genómicas funcionales, identificando genes implicados en resistencia a tratamientos, vulnerabilidades tumorales o mecanismos de adaptación celular al estrés.

En organismos modelo, el sistema CRISPR ha permitido una aceleración notable en la generación de líneas transgénicas y knock-out en especies como el ratón, la rata, el pez cebra, la mosca *Drosophila melanogaster* (Langmüller *et al.*, 2022) y el nematodo *Caenorhabditis elegans* (Fischer *et al.*, 2022), entre otros. La posibilidad de introducir modificaciones directamente en cigotos o embriones tempranos ha reducido drásticamente el tiempo necesario para obtener individuos portadores de mutaciones específicas, en comparación con las estrategias clásicas basadas en células madre embrionarias. Esto ha facilitado la creación de modelos animales que reproducen con mayor fidelidad alteraciones genéticas humanas, tanto en enfermedades monogénicas como en patologías complejas. De forma análoga, en plantas de interés agrícola se emplea CRISPR para mejorar características como la tolerancia a estrés biótico y abiótico, el rendimiento o la calidad nutricional, evitando en algunos casos la introducción de material genético exógeno y acercándose a modificaciones indistinguibles de mutaciones espontáneas.

En el campo de la medicina, el sistema CRISPR ha tenido un impacto particularmente profundo. La posibilidad de corregir mutaciones patogénicas directamente en el genoma ha situado a esta tecnología en el centro del desarrollo de terapias génicas de nueva generación. Diversos ensayos clínicos han demostrado su potencial en enfermedades monogénicas. En oncología, CRISPR se emplea para editar células inmunitarias adoptivas, potenciando su capacidad de reconocer y destruir

células tumorales. Asimismo, se explora su uso en enfermedades neurodegenerativas, cardiometabólicas e infecciones virales persistentes, como el VIH, donde aún se requieren enfoques de edición altamente controlada.

La incorporación del sistema CRISPR en la medicina ha transformado el panorama de las terapias génicas, posicionándolo como una de las herramientas más prometedoras para abordar enfermedades que, hasta hace poco, eran consideradas intratables. Una de las aplicaciones médicas más relevantes se centra en el tratamiento de trastornos monogénicos, en los cuales la corrección o modulación de un único gen puede tener un impacto clínico significativo. En el caso de la anemia de células falciformes y la beta talasemia, por ejemplo, CRISPR ha permitido la edición de células madre hematopoyéticas extraídas de los propios pacientes, reprogramándolas para reactivar la producción de hemoglobina fetal o corregir mutaciones específicas (Inam *et al.*, 2025; Sharma *et al.*, 2025; Vermersch *et al.*, 2025). Estos enfoques *ex vivo*, que posteriormente requieren el trasplante de las células editadas de regreso al paciente, han mostrado resultados clínicos prometedores y se perfilan como alternativas duraderas a los tratamientos convencionales, reduciendo la dependencia de transfusiones y mejorando la calidad de vida. Además, terapias basadas en el CRISPR han probado ser efectivas en la reducción de los ataques de angioedema, conduciendo a una reducción sólida y sostenida de los niveles totales de calicreína plasmática en pacientes con angioedema hereditario. (Cohn *et al.*, 2025)

En el ámbito de la oncología, CRISPR ha abierto nuevas vías para potenciar las terapias celulares adoptivas. Las células T modificadas para expresar receptores quiméricos (CAR-T) han demostrado una eficacia notable en ciertos tipos de leucemia y linfoma; sin embargo, su función puede ser limitada por mecanismos de evasión tumoral (Zhang *et al.*, 2025). La introducción de CRISPR permite editar múltiples genes en estas células, eliminando receptores inhibidores, aumentando su persistencia en el organismo o incorporando características que mejoren su capacidad citotóxica frente a células cancerígenas sólidas (Minucci *et al.*, 2024). Asimismo, se han desarrollado estrategias para generar células T universalizadas, derivadas de donantes sanos y editadas para evitar el rechazo inmunológico, lo cual representa un paso importante hacia terapias más accesibles y escalables. En

paralelo, la edición de linfocitos NK, macrófagos y células dendríticas mediante CRISPR está ampliando el repertorio de herramientas inmunoterapéuticas con potencial clínico.

Las enfermedades infecciosas también constituyen un campo de interés creciente, especialmente aquellas causadas por patógenos persistentes o de difícil erradicación. En el caso del VIH, se han desarrollado aproximaciones experimentales dirigidas a cortar secuencias provirales integradas en el genoma de células hospedadoras, con el objetivo de eliminar depósitos latentes que escapan a la terapia antirretroviral tradicional (Qu *et al.*, 2025). Si bien estas estrategias se encuentran aún en etapas tempranas, representan un paradigma innovador orientado a la cura funcional. Por otro lado, variantes como CRISPR-Cas13, capaces de atacar ARN viral, han sido empleadas en investigaciones preclínicas para inhibir replicación en infecciones como influenza, virus respiratorio sincitial o SARS- CoV-2, sugiriendo un potencial significativo para terapias antivirales de nueva generación (Fang *et al.*, 2023).

Los avances recientes también han impulsado la exploración de aplicaciones *in vivo*, en las cuales el sistema CRISPR se administra directamente al organismo para editar tejidos específicos. Este enfoque se ha aplicado en estudios clínicos para tratar amaurosis congénita de Leber, una enfermedad genética de la retina, mediante la edición directa de células oculares con vectores virales adenoasociados (Jo *et al.*, 2019). Su diseño se basa en el hecho de que la retina es un tejido accesible, inmunológicamente privilegiado y cuyas células presentan baja tasa de división, lo que favorece un entorno estable para la edición genética. Resultados preliminares han mostrado mejoras parciales en la sensibilidad a la luz, señalando la viabilidad del enfoque. Sin embargo, el éxito de estas terapias depende en gran medida de la eficiencia de los sistemas de entrega, del control de la respuesta inmune y de la minimización de efectos fuera del sitio previsto.

En conjunto, las aplicaciones médicas del sistema CRISPR se encuentran en una fase de rápida expansión, alimentadas por avances en ingeniería de nucleasas, diseños de ARN guía más específicos y métodos de entrega más seguros. El potencial terapéutico es vasto, abarcando tanto enfermedades de base genética como patologías adquiridas, y la convergencia entre investigación básica, biotecnología clínica y regulación bioética será determinante para su implementación responsable en la medicina del futuro.

No obstante, la transición del sistema CRISPR hacia aplicaciones clínicas enfrenta desafíos sustanciales y existen cuestiones muy controversiales que deben ser analizadas con mucha precisión.

A pesar del progreso significativo, el uso de CRISPR en medicina continúa enfrentándose a retos importantes desde el punto de vista bioético. Entre ellos se encuentran la necesidad de garantizar una edición precisa con baja tasa de mutaciones no deseadas, la superación de barreras asociadas a la entrega del sistema en tejidos profundos y la gestión de respuestas inmunitarias frente a proteínas bacterianas como Cas9. Además, la aplicación clínica requiere demostrar seguridad y eficacia en estudios de largo plazo, lo cual es esencial para evitar complicaciones derivadas de inserciones genómicas accidentales o consecuencias fisiológicas imprevistas (Getahun *et al.*, 2022).

Otras limitaciones técnicas podrían ser los efectos fuera del sitio previsto, la eficiencia variable de los mecanismos de reparación y los riesgos de toxicidad derivados del uso prolongado o descontrolado de la nucleasa (Chandrasekaran, 2021). Además, la introducción del sistema en organismos vivos requiere vehículos de entrega seguros, como vectores virales o nanopartículas, cuyo diseño óptimo sigue constituyendo una de las áreas de investigación más activas. A estos retos se suman consideraciones éticas profundas, particularmente en el caso de la edición de células germinales o embriones humanos, donde la intervención podría generar consecuencias hereditarias impredecibles.

El principio de justicia introduce una dimensión adicional de complejidad, al plantear interrogantes sobre el acceso equitativo a las terapias basadas en CRISPR. El elevado costo asociado al desarrollo, validación y aplicación clínica de estas tecnologías puede limitar su disponibilidad a determinados sistemas de salud o grupos socioeconómicos, generando desigualdades en el acceso a tratamientos potencialmente curativos. A esto se le suma la llamada “guerra de patentes”, en la que las empresas, unas u otras, se verán obligadas a renegociar sus acuerdos con las consiguientes posibles pérdidas económicas para unas y ganancias para otras. Probablemente todo se reorganice por medio de sublicencias para campos o fines concretos.

El futuro del sistema CRISPR apunta hacia un desarrollo cada vez más preciso, seguro y versátil, impulsado por la necesidad de superar las limitaciones técnicas y bioéticas que aún acompañan su uso. En el ámbito tecnológico, una de las líneas de avance más prometedoras es la ingeniería de

nuevas variantes de nucleasas con mayor especificidad y menor riesgo de efectos fuera del sitio previsto. El desarrollo de proteínas Cas de alta fidelidad, así como la identificación de nucleasas provenientes de distintos microorganismos con requisitos de reconocimiento menos restrictivos y tamaños más pequeños, lo que facilita el empaquetamiento en vectores virales, amplía el repertorio de herramientas disponibles para intervenciones terapéuticas más ajustadas a distintos contextos celulares. Del mismo modo, la optimización de ARN guía con estructuras secundarias mejoradas y algoritmos predictivos de diseño más exactos permitirá reducir aún más la probabilidad de cortes no deseados.

Otra dirección crucial para el CRISPR es la mejora de las plataformas de edición que evitan rupturas de doble cadena, como la edición de bases y la edición primaria. Estas tecnologías emergentes ofrecen la posibilidad de corregir mutaciones puntuales de manera más controlada, lo cual es particularmente relevante para enfermedades monogénicas en las que una sola sustitución de nucleótido determina la patogenicidad. A medida que estas técnicas se perfeccionen y se validen en modelos animales más complejos, podrán convertirse en alternativas terapéuticas más seguras para su aplicación clínica. Paralelamente, los sistemas CRISPR orientados al ARN, como las plataformas basadas en Cas13, podrían consolidarse como herramientas para modular la expresión génica transitoria y para el tratamiento de enfermedades en las que la intervención sobre el ADN no es deseable o implica riesgos elevados.

Finalmente, el futuro de CRISPR estará fuertemente influido por la consolidación de marcos regulatorios éticos y legales que acompañen su implementación. La edición de células germinales y embriones humanos continuará siendo un punto crítico de debate, lo que exigirá consenso internacional para establecer límites claros y prevenir usos indebidos. En paralelo, la participación informada de pacientes, profesionales de la salud y bioeticistas será clave para garantizar que el desarrollo de terapias basadas en CRISPR se realice bajo principios de equidad, transparencia y responsabilidad social.

En conjunto, el sistema CRISPR representa la convergencia entre la biología molecular, la bioquímica estructural y la biotecnología moderna, al integrar conocimientos fundamentales sobre la organización y función del genoma con herramientas capaces de intervenir de manera dirigida y eficiente. Su

comprensión detallada, tanto desde el punto de vista mecanístico como aplicado, resulta esencial para evaluar con rigor su potencial terapéutico y sus implicaciones en la medicina contemporánea. A lo largo de esta revisión, se ha puesto de manifiesto que CRISPR ha transformado profundamente la investigación biomédica, al facilitar el estudio funcional de genes, la generación acelerada de modelos experimentales y el desarrollo de estrategias innovadoras para el tratamiento de enfermedades de origen genético, oncológico e infeccioso.

Los avances alcanzados en el ámbito clínico, particularmente en terapias *ex vivo* y en aplicaciones *in vivo* en tejidos específicos, confirman que el sistema CRISPR ha dejado de ser una herramienta exclusivamente experimental para convertirse en una plataforma con impacto real en la práctica médica. Sin embargo, este progreso va acompañado de desafíos técnicos significativos, entre los que destacan los efectos fuera del sitio previsto, las limitaciones en los sistemas de entrega y las posibles respuestas inmunitarias frente a componentes bacterianos. Estas limitaciones subrayan la necesidad de continuar perfeccionando las variantes de nucleasas, los diseños de ARN guía y las tecnologías de edición sin ruptura de doble cadena, con el objetivo de maximizar la seguridad y la eficacia de las intervenciones terapéuticas.

Asimismo, el desarrollo y la aplicación clínica de CRISPR plantean dilemas bioéticos de considerable relevancia, que obligan a una reflexión responsable sobre los límites de la edición genética. La distinción entre intervenciones en células somáticas y germinales, el riesgo de transmisión hereditaria de modificaciones genómicas y las desigualdades en el acceso a terapias avanzadas constituyen aspectos que deben abordarse desde los principios de beneficencia, no maleficencia y justicia. En este sentido, la regulación ética y legal, junto con modelos de innovación que promuevan un acceso equitativo, será determinante para asegurar que los beneficios de esta tecnología se distribuyan de manera justa y socialmente responsable.

En perspectiva, el futuro del sistema CRISPR dependerá de la capacidad de la comunidad científica, médica y regulatoria para equilibrar la innovación tecnológica con la prudencia ética. La integración de CRISPR con enfoques de medicina personalizada, inteligencia artificial y modelos celulares avanzados promete ampliar aún más su impacto en la biomedicina. No obstante, solo mediante una

evaluación crítica y multidisciplinaria será posible consolidar a CRISPR como una herramienta transformadora que contribuya de manera sostenible y ética al progreso de la medicina del siglo XXI.

## Referencias bibliográficas

- Abdi, G., Tarighat, M. A., Jain, M., Tendulkar, R., Tendulkar, M., & Barwant, M. (2024). Revolutionizing genomics: exploring the potential of next-generation sequencing. In *Advances in Bioinformatics* (pp. 1-33). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-981-99-8401-5\\_1](https://doi.org/10.1007/978-981-99-8401-5_1)
- Barrangou, R. (2015). The roles of CRISPR–Cas systems in adaptive immunity and beyond. *Current Opinion in Immunology*, 32, 36-41. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.coi.2014.12.008>
- Baum, C., Kustikova, O., Modlich, U., Li, Z., & Fehse, B. (2006). Mutagenesis and Oncogenesis by Chromosomal Insertion of Gene Transfer Vectors. *Human Gene Therapy*, 17(3), 253-263. <https://doi.org/10.1089/hum.2006.17.253>
- Chandrasekaran, A.R. (2021). Nuclease resistance of DNA nanostructures. *Nat Rev Chem* 5, 225–239 <https://doi.org/10.1038/s41570-021-00251-y>
- Chauhan, S., Jaiswal, V., Attri, C., & Seth, A. (2020). Random Mutagenesis of Thermophilic Xylanase for Enhanced Stability and Efficiency Validated through Molecular Docking. *Recent patents on biotechnology*, 14(1), 5–15. <https://doi.org/10.2174/1872208313666190719152056>
- Cohn, D. M., Gurugama, P., Magerl, M., Katelaris, C. H., Launay, D., Bouillet, L., . . . Longhurst, H. J. (2025). CRISPR-Based Therapy for Hereditary Angioedema. 392(5), 458-467. <https://doi.org/doi:10.1056/NEJMoa2405734>
- Fang, L., Yang, L., Han, M., Xu, H., Ding, W., & Dong, X. (2023). CRISPR-cas technology: A key approach for SARS-CoV-2 detection. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 11, 1158672. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2023.1158672>

- Fischer, F., Benner, C., Goyala, A., Grigolon, G., Vitiello, D., Wu, J., ... & Ristow, M. (2022). Ingestion of single guide RNAs induces gene overexpression and extends lifespan in *Caenorhabditis elegans* via CRISPR activation. *Journal of Biological Chemistry*, 298(7). <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.102085>
- Ganger, S., Harale, G., & Majumdar, P. (2023). Clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated (CRISPR/Cas) systems: Discovery, structure, classification, and general mechanism. In *CRISPR/Cas-Mediated Genome Editing in Plants* (pp. 65-97). Apple Academic Press.
- Getahun, Y. A., Ali, D. A., Taye, B. W., & Alemayehu, Y. A. (2022). Multidrug-resistant microbial therapy using antimicrobial peptides and the CRISPR/Cas9 system. *Veterinary Medicine: Research and Reports*, 173-190. <https://doi.org/10.2147/VMRR.S366533>
- Ghosh, S. K., & Chatterjee, T. (2024). Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR)-Associated Proteins (Cas)[CRISPR–Cas]: An Emerging Technique in Plant Disease Detection and Management. In *Gene Editing in Plants: CRISPR-Cas and Its Applications* (pp. 589-645). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-981-99-8529-6\\_22](https://doi.org/10.1007/978-981-99-8529-6_22)
- Inam, Z., Han, H., Webb, J., & Delaney, M. (2025). Gene Therapies for Hemoglobinopathies: Efficacy, Cell Collection & Transfusion Support. *Transfusion medicine reviews*, 39(4), 150930. <https://doi.org/10.1016/j.tnrv.2025.150930>
- Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M, Nakata A (1987). "Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product". *Journal of Bacteriology*. 169 (12): 5429– 5433. [doi:10.1128/jb.169.12.5429-5433.1987](https://doi.org/10.1128/jb.169.12.5429-5433.1987)
- Jansen R, Embden JD, Gaastra W, Schouls LM (March 2002). "Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes". *Molecular Microbiology*. 43 (6): 1565– 1575. [doi:10.1046/j.1365-2958.2002.02839.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02839.x)

- Jo, D. H., Song, D. W., Cho, C. S., Kim, U. G., Lee, K. J., Lee, K., . . . Kim, J.-S. J. S. a. (2019). CRISPR-Cas9-mediated therapeutic editing of Rpe65 ameliorates the disease phenotypes in a mouse model of Leber congenital amaurosis. 5(10), <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2022.11.021>
- Khan, Z., Ali, Z., Khan, A. A., Sattar, T., Zeshan, A., Saboor, T., & Binyamin, B. (2022). History and classification of CRISPR/Cas system. In *The CRISPR/Cas tool kit for genome editing* (pp. 29-52). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-981-16-6305-5\\_2](https://doi.org/10.1007/978-981-16-6305-5_2)
- Krämer, O., Klausing, S., & Noll, T. (2010). Methods in mammalian cell line engineering: from random mutagenesis to sequence-specific approaches. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 88(2), 425-436. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2798-6>
- Langmüller, A. M., Champer, J., Lapinska, S., Xie, L., Metzloff, M., Champer, S. E., . . . Messer, P. W. (2022). Fitness effects of CRISPR endonucleases in *Drosophila melanogaster* populations. *eLife*, 11, e71809. <https://doi.org/10.7554/eLife.71809>
- Lessard, S., Rimmelé, P., Ling, H., Moran, K., Vieira, B., Lin, Y. D., Rajani, G. M., Hong, V., Reik, A., Boismenu, R., Hsu, B., Chen, M., Cockroft, B. M., Uchida, N., Tisdale, J., Alavi, A., Krishnamurti, L., Abedi, M., Galeon, I., Reiner, D., . . . Hicks, A. (2024). Zinc finger nuclease-mediated gene editing in hematopoietic stem cells results in reactivation of fetal hemoglobin in sickle cell disease. *Scientific reports*, 14(1), 24298. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-74716-7>
- Liu, Y., Cottle, W. T., & Ha, T. J. T. i. G. (2023). Mapping cellular responses to DNA double-strand breaks using CRISPR technologies. 39(7), 560-574. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2023.02.015>
- Lu, Z., Liu, Z., Mao, W., Wang, X., Zheng, X., Chen, S., Cao, B., Huang, S., Zhang, X., Zhou, T., Zhang, Y., Huang, X., Sun, Q., & Li, J. D. (2020). Locus-specific DNA methylation of *Mecp2* promoter leads to autism-like phenotypes in mice. *Cell death & disease*, 11(2), 85. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-2290-x>

- Marraffini LA (2015). "CRISPR-Cas immunity in prokaryotes". *Nature*. 526 (7571): 55–61. Bibcode:2015Natur.526...55M. [doi:10.1038/nature15386](https://doi.org/10.1038/nature15386)
- Minucci, S., Gruver, S., Subramanian, K., & Renardy, M. (2024). A multi-scale semi-mechanistic CK/PD model for CAR T-cell therapy. *Frontiers in systems biology*, 4, 1380018. <https://doi.org/10.3389/fsysb.2024.1380018>
- Mohamadi, S., Bostanabad, S. Z., & Mirnejad, R. (2020). CRISPR arrays: A review on its mechanism. <https://doi.org/10.30491/JABR.2020.109380>
- Mojica FJ, Montoliu L (2016 a). "On the Origin of CRISPR-Cas Technology: From Prokaryotes to Mammals". *Trends in Microbiology*. 24 (10): 811–820. [doi:10.1016/j.tim.2016.06.005](https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.06.005)
- Mojica FJ, Rodriguez-Valera F (2016 b). "The discovery of CRISPR in archaea and bacteria". *The FEBS Journal*. 283 (17): 3162–3169. [doi:10.1111/febs.13766](https://doi.org/10.1111/febs.13766). [hdl:10045/57676](https://hdl.handle.net/10045/57676)
- Pennisi E (2013). "The CRISPR craze". *News Focus. Science*. 341 (6148): 833–836. [Bibcode:2013Sci...341..833P. doi:10.1126/science.341.6148.833](https://doi.org/10.1126/science.341.6148.833).
- Qu, L., Meng, L., Sun, X., Cui, W., Shi, J., Wang, Y., Hu, Q., Xu, S., Sun, B., & Liang, C. (2025). CRISPR/Cas-Based Electrochemical Biosensor for Human Immunodeficiency Virus-1 Nucleic Acid Amplification-Free Detection to the Attomolar Level. *ACS sensors*, 10(8), 5613–5622. <https://doi.org/10.1021/acssensors.5c00363>
- Rawat A, Roy M, Jyoti A, Kaushik S, Verma K, Srivastava VK (2021). "Cysteine proteases: Battling pathogenic parasitic protozoans with omnipresent enzymes". *Microbiological Research*. 249 126784. [doi:10.1016/j.micres.2021.126784](https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126784)
- Sharma, A., Locatelli, F., Bhatia, M., Molinari, L., Mapara, M. Y., Liem, R. I., Dedeken, L., Wall, D., Eckrich, M. J., Kuo, K. H. M., Smith, W., Imren, S., Kohli, P., Li, N., Liu, T., Rubin, J., Hobbs, W., Grupp, S. A., & Frangoul, H. (2025). Improvements in health-related quality of life in patients with severe sickle cell disease after exagamglogene autotemcel. *Blood advances*, 9(24), 6481–6490. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2025016701>

- Tang, H., Yuan, H., Du, W., Li, G., Xue, D., & Huang, Q. J. F. i. m. b. (2021). Active-site models of *Streptococcus pyogenes* Cas9 in DNA cleavage state. 8, 653262. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.653262>
- Vermersch, A., Gervaise, C., Rasclé, P., Laflotte, A., Tawil, S., Delpech, L., Schwiertz, V., & Bréant, V. (2025). Analyse de risques selon la méthode AMDEC appliquée au circuit pharmaceutique d'un médicament de thérapie génique ex vivo CASGEVY® dans la bêta-thalassémie [Application of the Failure Mode and Effects Analysis (FMEA) to the pharmaceutical process of CASGEVY®, an ex vivo Gene Therapy Medicinal Product for beta-thalassemia]. *Annales pharmaceutiques françaises*, S0003-4509(25)00191-9. Advance online publication. <https://doi.org/10.1016/j.pharma.2025.12.003>
- Wan, H., Li, J. M., Ding, H., Lin, S. X., Tu, S. Q., Tian, X. H., Hu, J. P., & Chang, S. (2020). An Overview of Computational Tools of Nucleic Acid Binding Site Prediction for Site-specific Proteins and Nucleases. *Protein and peptide letters*, 27(5), 370–384. <https://doi.org/10.2174/0929866526666191028162302>
- Yang, H., Ren, S., Yu, S., Pan, H., Li, T., Ge, S., . . . Xia, N. J. I. j. o. m. s. (2020). Methods favoring homology-directed repair choice in response to CRISPR/Cas9 induced-double strand breaks. 21(18), 6461. <https://doi.org/10.3390/ijms21186461>
- Zhang, Z. A., Herring, L., Shwe, T. H., Hu, Y., Song, X., Cao, W., & Liu, W. R. (2025). Precise Control of Switchable Chimeric Antigen Receptor T Cells Allows Enhanced Safety and Less T Cell Exhaustion. *bioRxiv: the preprint server for biology*, 2025.12.07.692875. <https://doi.org/10.64898/2025.12.07.692875>
- Zubair, A., Ali, M., Ahmad, F., & Althobaiti, S. A. (2025). Unlocking the role of transcription activator- like effector nuclease (TALENs) and zinc finger nuclease (ZFN) in the treatment of HIV. *Molecular biology reports*, 52(1), 948. <https://doi.org/10.1007/s11033-025-10993-3>