

**BIOLOGIA MOLECULAR EN LA CLINICA  
UNIVERSIDAD DEL SURESTE**

**24 de noviembre 2020**

Medicina Humana

Alumna: Axel Guadalupe Ceballos Salas

Materia: Biología molecular en la clínica

Titular de la materia: Dr. José Miguel Culebro Ricaldi

Octavo semestre

Periodo: Agosto-Diciembre

## CRISPR/Cas9

La ingeniería genética está experimentando un impulso renovador. Una década después del Proyecto del Genoma Humano, que no rindió todos los frutos esperados, ha irrumpido una técnica cuyas posibilidades parecen infinitas. CRISPR/Cas9, unas tijeras moleculares que modifican el ADN en puntos escogidos con una precisión sin precedentes, está generando nuevas esperanzas. La estrategia ya está revolucionando todas las áreas de la ingeniería genética, y se considera indiscutible que sus descubridores serán merecedores de un premio Nobel. No obstante, el método no se halla exento de problemas. Los efectos no deseados que puede provocar, las limitaciones técnicas y las objeciones éticas representan importantes obstáculos de la edición genética.

¿Cómo funciona CRISPR/Cas9?

La técnica de edición genética CRISPR/Cas9 se basa en un complejo sistema inmunitario de las bacterias que les protege contra los virus. Se trata de una inmunidad adquirida, o adaptativa, que «recuerda» las secuencias de ADN de los patógenos de ataques anteriores y corta su ADN en caso de una nueva infección.

Es precisamente esta combinación de reconocimiento y corte la que utiliza la técnica CRISPR/Cas9. En la variante más simple, se inyecta en la célula ARN que codifica una proteína llamada Cas9 y una secuencia de reconocimiento. La célula emplea el ARN para sintetizar la proteína, la cual se pone a trabajar junto con el ARN de reconocimiento añadido: Cas9 corta el ADN de doble cadena exactamente donde el fragmento de ARN asociado le indica que lo haga. Dado que es posible sintetizar artificialmente cualquier secuencia de ARN, tal combinación permite cortar cualquier genoma en cualquier lugar, al menos teóricamente.

Las llamadas secuencias CRISPR, presentes en el material genético de las bacterias, se conocen desde la década de 1980. El microbiólogo Francisco J. M. Mojica, de la Universidad de Alicante, contribuyó en una parte fundamental a su descubrimiento y denominación. La abreviatura significa «repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente espaciadas», es decir, secuencias palindrómicas cortas repetidas que están separadas por otro material genético y que con frecuencia aparecen en el genoma en ubicaciones específicas. Resultó que el material genético que había entre las secuencias repetidas a menudo procedía de virus, lo que permitió deducir que CRISPR correspondía a un sistema que permitía a las bacterias defenderse de ellos.

Más tarde, se observó que todas las bacterias con dicho sistema presentaban, en la vecindad de CRISPR, unos genes asociados que se denominaron cas. Estos constituyen el elemento esencial de la defensa antivírica. El sistema CRISPR de la bacteria «cosecha» ADN vírico e integra partes de él entre las secuencias repetidas del genoma bacteriano. Como resultado, la célula produce ARN complementario del ADN vírico y lo ensambla con proteínas Cas. Si un virus intenta infectar de nuevo la célula con este ADN, el ARN «reconoce» el genoma del virus y, a continuación, las proteínas Cas lo cortan para que no vuelva a causar daños.

El origen de la técnica de edición genética se basa en el descubrimiento de que las proteínas Cas cortan cualquier ADN siempre que se les proporcione un ARN de reconocimiento adecuado, y esto es lo que hace CRISPR/Cas9. Después del corte, se confía en los mecanismos naturales de reparación de la célula, los cuales se ponen en marcha de forma espontánea.

Si en ese momento solo las dos partes del genoma se hallan separadas, interviene un mecanismo de reparación celular que las vuelve a conectar, aunque a menudo resulta impreciso y produce los llamados indeles, pequeños fragmentos de ADN que se insertan o eliminan en el punto de corte y que pueden inutilizar los genes implicados. Sin embargo, cuando el ADN flota libremente en la célula con los dos cabos sueltos, interviene otro sistema más preciso, denominado reparación por recombinación homóloga (HDR), que los vuelve a conectar y da lugar a cambios específicos en el genoma.

### **¿Cuáles son los problemas éticos?**

Los expertos han estado debatiendo desde hace tiempo sobre los problemas éticos fundamentales asociados a la modificación genética en los seres humanos. Pero hasta ahora el debate había sido puramente hipotético, ya que los procedimientos eran demasiado burdos e imprecisos como para poderlos trasladar en serio en ensayos con humanos. Pero la edición genética permite en principio introducir cambios en el genoma con una elevada precisión. De hecho, ya en 2015, varios grupos de trabajo chinos informaron de que, mediante el método

CRISPR/Cas9, habían intentado eliminar de embriones humanos ciertas enfermedades hereditarias. Reparar genes que provocan dolencias es actualmente la aplicación más obvia en los humanos, puesto que nadie puede objetar en contra de sus fines terapéuticos.

Sin embargo, el problema más urgente no son las posibles consecuencias de los bebés de diseño, sino, en primer lugar, las consecuencias que tales experimentos tendrán en vista del conocimiento extraordinariamente incompleto que se tiene de los efectos genéticos reales. Las investigaciones para crear un bebé «a medida» pueden conllevar décadas, pero no está claro si tal espera disuadirá a todo el mundo. Quizás tales experimentos simplemente se prohíban, como sucedió con unos experimentos de 2015 en los que se aumentaba la capacidad infecciosa de ciertos virus.

Por el contrario, la eliminación de enfermedades hereditarias ya se halla en la agenda. En algunos casos, la corrección de un solo un gen, o tal vez un solo alelo, probablemente será factible pronto. La mayoría de los expertos consideran que esta opción es éticamente justificable.

### **¿Cuáles son las limitaciones de CRISPR/Cas9?**

En su origen biológico, CRISPR/Cas9 es un instrumento de destrucción: una rotura en una doble hebra representa una intervención bastante drástica del genoma y, a menudo, no puede repararse sin dejar un daño permanente. Esta propiedad puede resultar útil cuando se pretende incapacitar un gen mediante los denominados indeles: pares de bases que se eliminan o se añaden y hacen que la sección del genoma resulta ilegible. Desafortunadamente, a veces también se producen indeles cuando se incorpora ADN adicional a través del sistema de reparación HDR.

Si se necesita practicar una modificación genética de alta precisión, como en las terapias génicas, las roturas de doble cadena del sistema CRISPR original son, por lo tanto, un problema fundamental que uno desea evitar. Las nuevas variantes de CRISPR/Cas9, por ejemplo, cortan solo una hebra, lo que reduce notablemente los indeles en lugares no deseados del genoma y mejoran mucho la precisión de la técnica.

Aun así, nunca pueden evitarse del todo los cambios no deseados del sistema CRISPR/Cas9, los que se producen en lugares del genoma distintos del que se pretendía. Estos pueden tener lugar porque la enzima de corte Cas9 funciona incluso si el ARN de reconocimiento difiere de la secuencia de ADN en hasta cinco lugares. Tales errores son extraordinariamente difíciles de identificar después. O puede suceder el efecto contrario en genes que supuestamente han sido inactivados: si bien la mutación deseada se incorpora en el lugar adecuado del genoma, el gen sigue «leyéndose» correctamente.

La actual técnica de CRISPR/Cas9 también presenta otros problemas. Aunque puede cortar con precisión una ubicación definida del genoma, necesita que en la proximidad exista una secuencia de genes específica que no puede seleccionarse a voluntad. Este es el caso en la mayoría de los genomas, si bien no en todos (y, naturalmente, nunca en el que uno está trabajando). Además, la maquinaria CRISPR/Cas es muy voluminosa, por lo que resulta difícil introducirla en las primeras células embrionarias de los mamíferos: el gen cas y el ARN reconocimiento son simplemente demasiado grandes para los «transportadores» genéticos que se emplean habitualmente, los virus que introducen el material genético en la célula de interés. El ARN debe inyectarse directamente, lo que limita la eficacia.

### **¿Cuáles serán las aplicaciones futuras de CRISPR/Cas9?**

En la investigación biotecnológica, CRISPR/Cas9 ha alcanzado una excelente posición como herramienta de ingeniería genética. Incluso se ha ido más allá con versiones nuevas que permiten regular de forma específica la actividad de los genes en el laboratorio. Para ello, se utiliza una proteína Cas9 inactivada, que se adhiere solo firmemente a fragmentos concretos de ADN. Si tal proteína se une a un dominio promotor, la actividad del gen correspondiente aumenta. Si, en cambio, bloquea la secuencia del gen en sí, el sector del genoma correspondiente deja de traducirse en ARN. Con la ayuda de diferentes proteínas unidas a sistemas Cas9 inactivos, ahora también es posible explorar los efectos epigenéticos, por ejemplo, marcando mediante fluorescencia la posición espacial de ciertas secuencias. Por medio de enzimas asociadas que

escinden o unen grupos metilo o acilo, tales sistemas CRISPR/Cas9 también pueden alterar la epigenética de las células.

### **¿Qué alternativas existen a la técnica CRISPR/Cas9?**

Una cosa es segura: a pesar de la sentencia en la disputa de patentes entre Emmanuelle Charpentier y Jennifer Doudna, por un lado, y Feng Zhang, por el otro, la batalla por los beneficios del método CRISPR/Cas9 no ha hecho más que empezar. Debido al enorme potencial de la técnica, las regalías se cuentan en miles de millones. Pero, si se mira en perspectiva, quizá no. Mientras que la Universidad de California todavía está en condiciones de obtener al menos de una parte del pastel, varios grupos de investigación han estado explorando otras opciones a la técnica.

Porque CRISPR/Cas9, como hemos visto, tiene desventajas y limitaciones. La más importante es que las tijeras genéticas solo son, en realidad, adecuadas para realizar un corte en el ADN. Si uno desea incorporar nuevo material genético, debe confiar en la célula. En muchos casos, la técnica no es lo suficientemente eficaz como para modificar varios genes a la vez, como se desea. Además, CRISPR/Cas9 no corta en todos los sitios del genoma.

Los métodos que precedieron a CRISPR/Cas9 no se han abandonado del todo: tanto las TALEN como las nucleasas con dedos de zinc, dos tipos de tijeras genéticas más antiguas, todavía se utilizan en la ingeniería genética. Estos procedimientos son mucho más complicados. Sin embargo, si además de los inconvenientes de CRISPR/Cas9 persiste durante más años la incertidumbre sobre los derechos de licencia, los expertos podrían alejarse de CRISPR/Cas9, al menos en lo que se refiere a la investigación con posibles aplicaciones comerciales.