



# UNIVERSIDAD DEL SURESTE

*OSCAR DE JESÚS GONZÁLEZ DEL CARPIO*

*8°SEMESTRE*

*DR. JOSE MIGUEL CULEBRO RICALDI*

*BIOLOGIA MOLECULAR EN LA CLÍNICA*

*MEDICINA HUMANA*

*UNIDAD 3*

**“ENSAYO”**



## ***FUNCIONAMIENTO Y APLICACIÓN DE LA TÉCNICA CRISPR-Cas9 EN EL CAMPO DE LA MEDICINA***

La técnica CRISPR-Cas9 está transformando las etapas que incluyen el descubrimiento y el desarrollo de un fármaco gracias a la facilidad y rapidez con la que permite la alteración genómica en los modelos mamíferos y en los tejidos humanos. Los tipos de mutaciones que se han explicado y su sencillez han permitido que esta herramienta sea una preferencia y se afiance sobre otras técnicas para el descubrimiento de medicamentos. El emparejamiento de CRISPR-Cas con vectores virales o basados en transposones ha permitido a los investigadores introducir directamente mutaciones somáticas en ciertos tejidos, como tejidos pulmonares y hepáticos, en animales adultos. La introducción in situ de mutaciones con CRISPR-Cas permite a los investigadores observar y estudiar con exactitud la iniciación, el desarrollo y el mantenimiento de la enfermedad en un entorno autóctono e inmunocompetente, incluyendo el microambiente nativo y la estructura tisular. Esta capacidad será transformadora para muchas enfermedades, en particular para el cáncer, en las que la interacción de células tumorales con células inmunitarias puede tener un efecto drástico en el resultado de la enfermedad. La técnica CRISPR-Cas9 también ha permitido reducir los costes y el tiempo de generación de los modelos animales. Los modelos de enfermedades basados en CRISPR se han generado con éxito para cáncer, enfermedades neurológicas y otras enfermedades Mendelianas o complejas enfermedades genéticas, para investigar los mecanismos moleculares relacionados con la patogénesis. Se va a mostrar cómo se han generado algunos de estos modelos murinos. El genoma del cáncer es altamente complejo, con cientos de mutaciones, translocaciones, y ganancias y pérdidas de cromosomas por tumor. Para su estudio es necesario crear modelos muy precisos, CRISPR-Cas9 se ha convertido en una herramienta imprescindible para crear estos modelos.

CRISPR-Cas9 puede utilizarse in vivo para generar rápidamente ratones portadores de tumores para estudiar tanto aspectos básicos como traslaciones del cáncer. El equipo de Ventura, ha aplicado in vivo CRISPR para realizar inversiones cromosómicas y modelizar el cáncer de pulmón. Se fijó como diana los genes EML4 y ALK del mismo cromosoma para que se produjera la inversión. Se introdujo el complejo CRISPR-Cas9 con un adenovirus que infecta eficientemente el epitelio del pulmón. Como resultado, crearon un ratón que expresaba EML4-ALK, lo que producía el desarrollo de tumores en el pulmón.

También se han generado modelos de cáncer de hígado al hacer diana del complejo Cas9-sgRNA los genes supresores de tumores, Pten y p53. Se logró que el complejo realizara su función específicamente en el hígado al liberar el plásmido por inyección hidrodinámica. En este experimento se suprimieron ambos genes por separado y en conjunto, dando un resultado muy similar a la tecnología Cre-LoxP.

La forma de liberación de la Cas9 con su sgRNA y sus posibles proteínas asociadas es una de los puntos más importantes en la generación de modelos in vivo en neurociencia. Hay diversos



métodos entre los que se destaca la utilización de vectores AAVs que proporcionan una expresión a largo plazo sin integración genómica, son relativamente seguros y no son patógenos.

Los métodos utilizados para generar modelos animales para enfermedades cardíacas son muy similares a los seguidos para las enfermedades neurológicas.

La utilización del multiplex CRISPR puede generar diversos tipos de ratones inmunodeprimidos por microinyección de embriones. Carroll et al. lograron generar ratones transgénicos Cas9 específicos para el corazón. Para que la edición fuera específica del corazón cambiaron el promotor de la Cas9 (CBh) por el promotor Myh6 (solo se expresa en cardiomiocitos). La construcción Myh6-Cas9-GFP se inyectó en los cigotos de ratones, el resultado eran modelos que expresaban Cas9 en los cardiomiocitos únicamente. Para testear estos ratones se introdujo en el vector AAV9 los sgRNAs con diana en los exones 3 y 8 del gen Myh6 y se inyectó intraperitonealmente. Esto inducía una dilatación masiva cardíaca y el fallo cardíaco a las 3 semanas.

Una de las aplicaciones más prometedoras de la técnica CRISPR-Cas es su desarrollo en el campo de la tecnología terapéutica para tratar desórdenes genéticos. En la actualidad ya se ha aplicado como terapia génica en varias enfermedades en modelos animales con resultados prometedores también ha sido aplicado por un equipo chino en un paciente humano que padecía cáncer de pulmón. Recientemente ha sido aprobada en US la utilización de CRISPR en humanos que padezcan tipos de cáncer que necesiten la inclusión de células T.

En el caso de un trastorno monogénico recesivo debido a mutaciones de pérdida de función (como fibrosis quística, anemia falciforme o distrofia muscular de Duchenne), Cas9 puede utilizarse para corregir la mutación causante. Este método tiene bastante ventaja sobre el método tradicional de aumentar el gen por la liberación de copias genéticas funcionales y su sobreexpresión vía un vector viral, ya que el nuevo gen funcional se expresa en su contexto natural.

Para los trastornos negativos dominantes en los que el gen afectado es haplosuficiente (como la amiloidosis hereditaria relacionada con la transtiretina o las formas dominantes de retinitis pigmentosa), también puede ser posible usar NHEJ para inactivar el alelo mutado para lograr un beneficio terapéutico.

Algunas enfermedades monogénicas también resultan de la duplicación de secuencias genómicas. Para estas enfermedades, la capacidad de multiplexación de Cas9 puede explotarse para suprimir los elementos duplicados. Por ejemplo, trastornos relacionados con repetición de trinucleótidos podrían ser tratados utilizando dos simultáneas DSB para cortar la repetición. El éxito de esta estrategia probablemente será mayor para enfermedades como la ataxia de Friedreich, en la que se producen duplicaciones en regiones no codificantes del gen diana.

La edición genómica mediada por Cas9 podría ser utilizada para introducir mutaciones protectoras en los tejidos somáticos para combatir las enfermedades no genéticas o complejas. Por ejemplo, la inactivación mediada por NHEJ del receptor CCR5 en linfocitos puede ser una



estrategia viable para eludir la infección por VIH, mientras que la delección de PCSK9 o angiopoietina pueden proporcionar efectos terapéuticos contra la hipercolesterolemia resistente a las estatinas o la hiperlipidemia. Aunque estos objetivos pueden también ser dirigidos usando la reducción de proteínas mediada por siRNA, una ventaja única de la inactivación génica mediada por NHEJ es la capacidad de lograr un beneficio terapéutico permanente sin la necesidad de continuar el tratamiento. Al igual que con todas las terapias genéticas, por supuesto será importante establecer que cada uso terapéutico propuesto tiene una relación beneficio-riesgo favorable.