



LA EDICIÓN GENÉTICA BASADA EN EL SISTEMA CRISPR/CAS9

Autores: Sigri Suset Arias Pérez¹, Ana Beatriz Calas Peña²

¹ Estudiante de Primer Año de Medicina Número telefónico: 58835838

E-mail: asigrisuset@gmail.com

² Especialista en Primer Grado en Histología Número telefónico: 53401102

E-mail: anitabeatriz@gmail.com

Universidad de Ciencias Médicas de Granma. Facultad de Ciencias Médicas de Bayamo

RESUMEN

El desarrollo de tecnologías que posibiliten editar o corregir con exactitud y eficacia el genoma de células vivas es uno de los objetivos primordiales de la investigación biomédica. En las últimas décadas se han investigado e implementado diferentes herramientas de edición genómica entre las cuales se destaca el sistema CRISPR/Cas9, un mecanismo de defensa bacteriano que ha sido adaptado y rediseñado para su empleo en otros modelos celulares. Dadas las prometedoras cualidades de esta tecnología y su ambicioso horizonte de aplicaciones, numerosas líneas de investigación se han abierto tanto para intentar salvar las limitaciones de su uso como para empezar a probarla frente a las principales enfermedades candidatas a terapia génica.

Palabras clave: Crispr/Cas9, ADN, edición genética, terapia génica.

Abstract

The development of technologies that make it possible to accurately and efficiently edit or correct the genome of living cells is one of the primary objectives of biomedical research. In recent decades, different genomic editing tools have been investigated and implemented, among which the CRISPR/Cas9 system stands out, a bacterial defense mechanism that has been adapted and redesigned for use in other cell models. Given the promising qualities of this technology and its ambitious horizon of applications, numerous lines of research have been opened both to try to overcome the limitations of its use and to begin testing it against the main diseases that are candidates for gene therapy.

Keywords: Crispr/Cas9, DNA, gene editing, gene therapy.



INTRODUCCIÓN

La edición del genoma o la ingeniería del genoma es un tipo de ingeniería genética en la que el ADN se altera en el genoma de una célula u organismo vivo, insertando, eliminando o modificando un gen o secuencia de genes para silenciar, mejorar o cambiar las características del gen. En este complejo proceso son utilizadas nucleasas modificadas genéticamente. (1)

La capacidad de editar y modificar de manera precisa el genoma abre un sinfín de posibilidades para investigar las propiedades de los sistemas vivos así como para avanzar en técnicas médicas y en aplicaciones de bioingeniería. Las tecnologías de edición genética han evolucionado rápidamente permitiendo un acercamiento en la obtención de un mecanismo que permita alterar el genotipo y fenotipo de los organismos con eficacia, especificidad y con el menor número de efectos colaterales.

Durante los años noventa del pasado siglo y la primera década del XXI, al mismo tiempo que se lograba la completa secuenciación del genoma humano, se hacían notables avances en tecnologías que permitían una edición genética verdaderamente precisa e integral, y que no solo consistían en el rudimentario "cortar y pegar" de la tecnología del ADN recombinante. Se empezaron a utilizar enzimas de restricción artificiales que ganaban en precisión, como las meganucleasas artificiales, las nucleasas con dedos de zinc o las TALEN (Transcription activator-like effector nuclease, cuya traducción es: sistemas nucleasas efectoras semejantes al activador de transcripción). (2)

Tan prometedores parecían estos métodos de edición genética que la revista Nature los calificó en 2011 como el método del año. En ese artículo, sin embargo, no se hacía referencia alguna a la herramienta de edición genética que se descubriría al año siguiente y que ha revolucionado este campo: Crispr/cas9, una herramienta prometedora de edición del genoma que tiene potencial terapéutico contra los trastornos genéticos incurables. Esta comprende una serie de componentes esenciales para la introducción de cambios o ediciones precisas en secuencias de ADN blanco.

En esta revisión bibliográfica se hace un análisis de la literatura disponible para exponer el desarrollo de esta tecnología hasta la fecha y las razones por las que constituye un avance con tanto potencial. Se evalúan, además, sus limitaciones en el área clínica y el conflicto bioético que ha suscitado por las posibilidades que ofrece relativas a la edición genética.

Problema científico

Insuficientes conocimientos por parte de la comunidad universitaria de las Ciencias Médicas acerca de Crispr-Cas9 y la trascendencia de su descubrimiento y utilización.

Objetivo

Realizar una recopilación y un análisis de una serie de investigaciones relativas a la edición genética basada en el sistema Crispr/Cas9, y proporcionar dicha



información a la comunidad universitaria, particularmente a los estudiantes y profesores de la Facultad de Ciencias Médicas de Granma.

DESARROLLO

¿Qué es CRISPR? Descubrimiento y evolución.

Los sistemas CRISPR (del inglés "clustered regularly interspaced short palindromic repeats", cuya traducción al español es "Repeticiones Palindrómicas Cortas Agrupadas y Regularmente Interespaciadas") fueron descubiertos de forma independiente por varios grupos de investigación en organismos procariontes a finales del siglo pasado, siendo el equipo de Ishino et al. el primero en detectarlos en *Escherichia coli* en 1987. Tratándose de un hallazgo casual, la función de estas regiones de ADN permaneció como una incógnita durante varios años. A pesar de esto, las singulares estructuras que observaron estos investigadores sin duda invitaban a su estudio: una serie de secuencias cortas homólogas, cuyos nucleótidos parecían seguir un orden palindrómico, se encontraban separadas unas de otras a una distancia constante por secuencias espaciadoras de tamaño similar.

Dos años más tarde, en 1989, el mismo grupo encontró repeticiones prácticamente idénticas, con el mismo patrón, muy cerca de las otras. Ese fue el primer artículo que se dedicó exclusivamente a las CRISPR, aunque estas secuencias no tenían nombre aún.

En 1991 hubo un grupo de microbiólogos holandeses que encontraron una región muy variable en la bacteria que produce la tuberculosis y quisieron usarlo para diferenciar distintas cepas de *Mycobacterium*, para saber cuál era el origen de los brotes epidémicos de tuberculosis. Encontraron que el causante de esa variabilidad eran secuencias repetidas cortas y regularmente espaciadas. (3)

En 1993 el equipo de Francisco Martínez Mojica, un científico español, publicó un artículo de resultados de trabajos previos utilizando microorganismos halófilos extremos (*Haloferax mediterranei*), cuyo hábitat se encuentra única y exclusivamente en las salinas de Santa Pola. Preocupados por entender cómo se adaptaban a condiciones tan extremas, secuenciaron un fragmento de ADN que podía estar implicado en esta adaptación y se tropezaron con unas secuencias repetidas cortas y regularmente espaciadas.

El equipo de Francisco Mojica et al. realizó el correspondiente descubrimiento en el dominio Archaea y, en el año 2000, este mismo autor publicó una revisión concluyendo que estos sistemas pertenecían a una familia de secuencias repetidas conservadas durante el proceso de evolución de distintas especies procariontes y las denominó short regularly spaced repeats (SRSRs).

En el verano de 2003 Mojica descubrió que algunas de las secuencias espaciadoras procedían de virus que infectaban o intentaban infectar a ese microorganismo, otras procedían de plásmidos, que son moléculas que se transfieren de unas bacterias a otras, y algunas de estas secuencias procedían también de regiones del cromosoma de otras bacterias muy relacionadas. Así descubrieron que el tener



un espaciador concreto que coincidía con la secuencia de un virus hacía que ese virus no pudiera infectar de forma eficaz a esa bacteria. Todo un sistema de defensa inmunitario adaptativo de base genética en procariotas. (4)

Dos años más tarde, Ruud Jansen identificó los genes asociados que se llamaron CAS ("CRISPR associated") adyacentes a las repeticiones descritas, lo que sumado a la revelación de una "secuencia líder", completó la descripción de los componentes de lo que actualmente conocemos como sistemas CRISPR/Cas. Con el beneplácito de Martínez Mojica, rebautizó las secuencias repetidas, que pasaron a denominarse clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR). Los descubrimientos de Mojica sentaron las bases para el posterior desarrollo de la técnica de edición genética, lo que le ha valido una nominación al Premio Nobel de Medicina de 2016, que finalmente no ha ganado. (5)

En 2007 el equipo de Rodolphe Barrangou publicó la demostración experimental de que aquello era un sistema de inmunidad adquirida.

En 2012 un grupo de la Universidad de Berkeley liderado por Jennifer Doudna y Emmanuelle Charpentier logró editar ADN mediante el CRISPR-Cas9 en un tubo de ensayo, e intuyeron que esto mismo se podría realizar en otro tipo de células, como las eucariotas, y que se podría usar como una herramienta de edición genética, aspecto que plasmaron en una publicación realizada en la revista Science en junio de 2012, donde describían los componentes del sistema CRISPR-Cas9 de una bacteria (*Streptococcus pyogenes*).

Posteriormente, ese mismo año, un equipo del Broad Institute, perteneciente a la Universidad de Harvard y al MIT, encabezado por Feng Zhang logró realizar el primer corte utilizando CRISPR/Cas9 sobre el genoma de una célula viva de mamífero. Zhang logró inscribir este hallazgo en el registro de patentes de los Estados Unidos. Actualmente, dicho registro se encuentra en un litigio legal con las investigadoras y ganadoras del premio nobel de Química 2020 Doudna y Charpentier. (6)

Mecanismo de acción de Crispr/Cas.

Aunque el descubrimiento de CRISPR constituye en sí mismo uno de los grandes hitos de los últimos años, el máximo potencial de este hallazgo se alcanzó con su adaptación como tecnología de edición genética. Esto fue posible gracias a la comprensión de su funcionamiento natural en las bacterias, tal como se describe a continuación:

Gran parte del mecanismo de acción de estos sistemas inmunes depende de las proteínas codificadas por los genes CAS. Con actividad nucleasa, estos productos son capaces de degradar el material genético extraño (tarea realizada por Cas1 y Cas2, presentes en todas las especies) e integrarlo como un nuevo espaciador en la región CRISPR, preferentemente en el extremo proximal a la secuencia líder. A partir de este punto, los distintos tipos de sistema CRISPR divergen en la forma de procesar los transcritos primarios de los espaciadores para convertirlos en secuencias guía (denominadas crARN), que posteriormente servirán a la bacteria



para identificar las bases complementarias del bacteriófago y defenderse de forma efectiva. En los sistemas tipo I y III, el ARN guía está constituido por una sola cadena de nucleótidos; mientras que en los sistemas tipo II, una cadena de tracrARN ("crARN trans-activador") complementaria al crARN se une al mismo para formar un ARN guía de doble cadena (sgARN).

El paso final es la unión del crARN con una proteína Cas endonucleasa que varía según el sistema. En el de tipo II, Cas9 es capaz de realizar un corte de tipo romo en la doble hebra de ADN (DSB "double strand break" o "corte de doble cadena") mediante sus dominios catalíticos HNH y RuvC. Para el reconocimiento de la región diana por parte de la enzima es necesario que en el ADN la secuencia homóloga a crARN esté próxima a una región PAM ("protospacer adjacent motif"), cuya estructura depende de la proteína Cas y su origen. En el caso de Cas9 de *Streptococcus pyogenes* (la variante más comúnmente utilizada por sus propiedades) PAM consiste en un triplete en el que cualquier nucleótido va seguido de otros dos con base guanina, -NGG-. Una vez completado el reconocimiento, Cas9 realiza el corte entre el tercer y cuarto nucleótido "corriente arriba" desde PAM. En cierto sentido, podemos comparar estas proteínas Cas con las enzimas de restricción tradicionales, siendo únicas por su capacidad de utilizar el ARN como guía en lugar de proteínas. (7)

Una vez producido el corte, se pone en marcha la maquinaria celular de reparación del daño en el DNA, existiendo dos vías para llevar a cabo este cometido: la vía de unión de extremos no homólogos (NHEJ) o la vía de reparación directa por homología (HDR). Dependiendo de la presencia o ausencia de un molde de reparación, se seguirá una u otra vía y, por lo tanto, se conseguirán diferentes resultados de edición genética. Además ha de tenerse en cuenta que la NHEJ resulta menos precisa pero más eficaz mientras que HDR presenta más precisión pero menos eficacia y dependencia del estado del ciclo celular. En ausencia de molde de reparación, se sigue la vía propensa a errores (NHEJ). En ella, tras la rotura DSB, los dos fragmentos resultantes son religados produciéndose inserciones o deleciones que, si se producen en el exón diana, pueden provocar knock-outs (desactivación de genes específicos usada en organismos de laboratorio para estudiar la función genética) y/o aparición de codones de terminación prematuros. En el caso contrario, para la activación de la vía HDR de reparación del DNA, se introduce exógenamente un molde con la secuencia diana que lleve incorporadas las modificaciones deseadas. El patrón empleado puede presentarse tanto en forma de DNA bicatenario o como oligonucleótido monocatenario, siendo necesario en ambos la presencia de homología con la secuencia en el DNA diana que flanquea la secuencia de inserción. (8)

Aplicaciones de Crispr/Cas9

La revolución que este sistema ha suscitado casi no tiene precedentes en las ciencias biológicas. La técnica disminuye considerablemente el tiempo necesario hasta ahora para alterar el genoma a voluntad, y muchos se han referido a ella como la democratización de la edición genética, porque ha colocado esta tecnología al alcance de cualquier laboratorio de biología molecular. (6)



Jennifer Doudna lo ha definido como un sistema para que los científicos eliminen o inserten con gran precisión pedazos específicos de ADN en células. (9). La posibilidad de alterar de forma específica el genoma representa una gama descomunal de oportunidades para la investigación de los sistemas vivos y para desarrollar técnicas médicas y progresar en el campo de la bioingeniería: se puede aplicar a estudios de identificación y función de genes silvestres en animales y sistemas celulares modelo, así como a la identificación de mutaciones genéticas o variantes epigenéticas asociadas a alteraciones de funciones biológicas o fenotipos patológicos.

Existen múltiples enfermedades para las que resulta eficaz la utilización de Crispr/Cas9. A pesar de que la tecnología es empleada generalmente para el tratamiento de enfermedades monogénicas, se ha investigado su capacidad para el abordaje terapéutico de enfermedades dependientes de múltiples alteraciones genéticas. Así pues, existen diferentes líneas de investigación relacionadas con esta herramienta para la erradicación de enfermedades de elevada carga genética y gran prevalencia mundial. (7) Por tanto, sus perspectivas en el campo de la medicina son amplias, con logrados avances en los últimos tiempos, a continuación se exponen algunos de los más trascendentales:

- **Tratamiento del Cáncer**

En la investigación contra el cáncer se encuentran diversas formas de aplicar esta tecnología. Algunas de ellas son el establecimiento de modelos cancerígenos, estudios funcionales de genes, estudios de resistencia a fármacos antitumorales, validación de dianas o diagnóstico genético. En este sentido, las publicaciones referidas a la aplicación de CRISPR/Cas9 en esta enfermedad han ganado popularidad a lo largo de los años, especialmente para leucemia y cáncer de pulmón.

Una de las aplicaciones de mayor interés de CRISPR-Cas9 consiste en el bloqueo o knockout de genes. La inactivación de los genes se consigue a través de la inducción de mutaciones en sus secuencias, alterándose el marco de lectura e interrumpiéndose los procesos de transcripción y traducción. Para conseguirlo es necesaria la formación de un vector que dirija y controle la expresión del gen. Una vez construido el vector, será incorporado a un cultivo de células embrionarias. El plásmido contenido reconocerá la secuencia de interés en las células, produciéndose un proceso de recombinación en el que el vector incorpora el gen endógeno, y el locus genómico de la célula huésped incorpora el gen contenido en el plásmido. Esta estrategia resulta especialmente útil para el control de oncogenes y ciertos elementos epigenéticos reguladores en el tratamiento del cáncer. Éstos fomentan el crecimiento anormal en las células, así como la proliferación descontrolada de células inmaduras e inhibición de la apoptosis de células tumorales. Mediante el uso CRISPR se puede silenciar la expresión de estos genes, de forma que se inhibe el desarrollo tumoral. A pesar de que existen diferentes dianas sobre las que aplicar esta herramienta se ha resaltado la importancia del receptor PD-1 en el proceso de aparición y desarrollo tumoral. Este receptor reconoce a PD-L1, una proteína de la superficie de la célula tumoral.



Esta interacción inhibe la cascada de señalización intracelular que activaría la célula T, de tal forma que ésta no puede destruir la célula cancerosa. Por tanto, el bloqueo de la expresión de PD-1 a través de CRISPR/Cas9 ayudará a las células T a realizar su actividad antitumoral. (10)

Específicamente en el cáncer colorrectal se han logrado reconocer mediante esta tecnología sistema de genes que constituyen blancos terapéuticos, además de favorecer la comprensión de la acción de determinadas proteínas en los procesos de tumorigénesis, quimiorresistencia e invasión y proliferación celular. Estudios en modelos in vitro e in vivo han demostrado su posible efectividad terapéutica y diagnóstica, sin embargo no hay suficientes ensayos clínicos que demuestren la aplicación de esta herramienta en humanos. (11) Sin embargo, en algunos países como US, ha sido aprobada la utilización de CRISPR en humanos que padezcan tipos de cáncer que necesiten la inclusión de células T. (12)

- **Descubrimiento y desarrollo de medicamentos**

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.

- **Aplicación a células madres: creación de modelos celulares y animales**

La aplicación de CRISPR-Cas9 a células madre ha permitido la corrección de mutaciones que causan enfermedad, la introducción de mutaciones para estudiar su efecto, la regulación de la expresión de genes de interés y la realización de experimentos a gran escala para investigar la función de los genes. Estas nuevas posibilidades experimentales son hoy en día utilizadas junto con las células madre para generar modelos celulares que permiten estudiar múltiples mecanismos, como es el caso de la diabetes asociada con mutaciones. Esto facilita obtener una idea más precisa de la contribución de estas mutaciones al desarrollo de la diabetes y corregir mutaciones en el genoma de las células derivadas de una persona con diabetes monogénica. (13)

Se han desarrollado también modelos de ratones que permiten evaluar el efecto deletéreo de mutaciones en el cáncer, con el uso de mutaciones de pérdida de función en genes supresores tumorales o de ganancia de función en oncogenes. Kaushik y colaboradores describen esta tecnología para el tratamiento del cáncer. Esta tecnología permite reducir los costes y el tiempo de generación de estos modelos, fundamentalmente los animales. Por ejemplo, la generación de un ratón modelo utilizando células madre embrionarias tardaba unos 12-18 meses y costaba alrededor de unos \$100,000. En cambio, con CRISPR estos modelos tardan unos 6-8 meses y cuestan unos \$35,000. El tiempo ahorrado es muy importante para los investigadores para poder validar cuanto antes sus descubrimientos sobre algún fármaco. Reconociendo las mutaciones genéticas en



poblaciones de pacientes, la edición basada en CRISPR puede ser usada para modelar rápidamente las variaciones genéticas y ver sus roles, en lugar de confiar en un modelo que solo exprese en su fenotipo uno de los trastornos. (7)

- **Aplicaciones en las enfermedades hereditarias**

β talasemia:

Otra de sus aplicaciones está reflejada en el rol significativo que desempeña en algunas enfermedades hereditarias, principalmente en las de herencia recesiva (en estos casos el alelo alterado es recesivo sobre el normal por lo que con una sola copia del alelo alterado no se expresa la enfermedad) que afectan a las células sanguíneas. Una de las más estudiadas es la β talasemia, un desequilibrio en la síntesis de las cadenas beta de la hemoglobina. Como causa de anemia severa, su tratamiento la mayor parte de las veces se realiza a partir de transfusiones periódicas, siendo una alternativa curativa el trasplante de células madre hematopoyéticas de un donante compatible.

Habiéndose comprobado la viabilidad de la inserción del gen por vectores virales (medio transportador que permitirá introducir el material genético de interés en el paciente, en este caso un virus) el equipo de Xie et al. decidió ir un paso más allá y emplear Cas9 en combinación con el transposón "piggyBac" en células pluripotenciales. Dicha tecnología tiene como función el transporte del ADN "donante" a modo de cassette desde un vector (en el caso de este estudio, un plásmido) hasta el sitio de corte, dejando únicamente el material de interés en el genoma. Con la corrección del gen mutado en ambos alelos, se comprobó un aumento sustancial en la transcripción del gen HBB, aunque la preferencia de los eritrocitos por la síntesis de hemoglobina fetal seguía siendo importante.

En un estudio posterior, el equipo de Liang et al. utilizó CRISPR/Cas frente a HBB en cigotos tripnucleares humanos (inviabiles y por ello aceptables para la investigación in vitro) con el fin de analizar la especificidad y fiabilidad de esta técnica. Entre las limitaciones que encontraron, cabe destacar la baja tasa de edición por homología y el uso de genes endógenos parecidos para realizar la misma (como HBD, que codifica para la subunidad delta de la hemoglobina). Un problema común con otros modelos fue la formación de mosaicismos en los embriones (encontrándose distintos tipos de alelos), así como las siempre presentes mutaciones "offtarget". (3)

Anemia falciforme:

Otra enfermedad provocada por mutación en HBB es la anemia drepanocítica o de células falciformes, aunque en este caso se debe al cambio de una base concreta y, por tanto, de un único aminoácido en la proteína codificada (se sustituye glutamato por valina). Esta discreta modificación tiene consecuencias importantes, ya que cambia la estructura cuaternaria de la hemoglobina y hace que el hematíe sea más propenso a la deformación (adquiriendo la característica forma de hoz); provocando a su vez daño vascular y, en última instancia, afectación multiorgánica. Los efectos de CRISPR/Cas ante esta entidad fueron



comprobados por DeWitt et al., que utilizaron ribonucleoproteínas (RNPs) en lugar de vectores virales para transportar por electroporación Cas9 y ARN guía junto con el ADN donante a células madre hematopoyéticas. Gracias a esto, consiguieron cierto nivel de reparación y aumentaron los niveles de transcripción de productos no patológicos; concluyendo que, aunque lograr en un futuro la curación de la enfermedad sería una tarea difícil, al menos se podría conseguir una mejoría clínica relevante. El bajo rendimiento de la reparación por homología fue una vez más un problema, pero se evitó la inserción de material viral y se redujo la tasa de mutaciones indeseadas gracias a las propiedades de la ribonucleoproteína como vector. (3)

Tratamiento del VIH

La aplicación de esta herramienta en la infección por VIH pasa por el bloqueo de determinados genes. El proceso de knockout se puede realizar directamente sobre el genoma viral, para anular la expresión del virus, y sobre ciertos genes de las células del sistema inmune encargados de la codificación de receptores esenciales en el proceso de reconocimiento del virus. En este último caso se realizaría a posteriori un trasplante autólogo con las células convenientemente modificadas.

Existen diferentes dianas en las que CRISPR-Cas9 puede actuar. Algunas de ellas se encuentran las secuencias LTR del genoma vírico, esenciales para los procesos de expresión genética. Para poder guiar al sistema hacia dichas regiones es necesario como guía un doble sgARN, ya que permite obtener más puntos de anclaje al material genético viral que un solo sgARN, y así prevenir sólidamente la evasión del virus. Con esta combinación se aumenta la eficiencia del corte del genoma proviral no integrado, previniendo su replicación y reduciéndose considerablemente los efectos fuera de objetivo.

Otra estrategia para anular la capacidad infectiva del virus es la inactivación del gen codificante para el co-receptor CCR5 de las células huésped. Se ha observado que individuos homocigotos para una delección de 32pb en dicho gen pueden resistir de forma natural una infección por VIH con tropismo hacia la región R5. La interrupción de este gen se consigue a través de la escisión del cuarto exón del gen CCR5, dándose la mutación CCR5 Δ 32. El silenciamiento del gen en distintas líneas celulares hematopoyéticas tendrá como resultado la producción de monocitos y macrófagos que no expresarán el co-receptor CCR5, de forma que no permitirán la invasión del virus. (10)

Aplicaciones en las enfermedades Alzheimer, Parkinson y Huntington

En este sentido sus aplicaciones repercuten tanto en materia de investigación como en desarrollo terapéutico no farmacológico. Los resultados de varias investigaciones muestran la capacidad del sistema para la corrección de mutaciones implicadas en la patogénesis de estas enfermedades, lo que fundamentaría su potencial aplicación como terapia génica personalizada en un futuro no muy lejano; asimismo, la tecnología CRISPR/Cas9 resulta sumamente atractiva para la caracterización de genes potencialmente patogénicos o



citoprotectores asociados a estas enfermedades, lo que enriquece el conocimiento que se tiene sobre la fisiopatología de estas enfermedades, además de contribuir al desarrollo de estrategias profilácticas de corrección de genotipos de riesgo genético, al desarrollo de modelos que permitan evaluar nuevos fármacos para el tratamiento sintomático, y a la caracterización de posibles biomarcadores tempranos que permitan un diagnóstico oportuno. (14)

La edición genómica de embriones por CRISPR/Cas9

En los últimos años hubo varios intentos de corrección de células y/o embriones humanos utilizando la técnica de CRISPR/Cas9, en algunos de los cuales se observó una alta tasa de efectos *off-target* y de mosaicismo. Esto pone en evidencia la necesidad, por un lado, de una mayor comprensión del funcionamiento del sistema CRISPR así como del entorno celular en el que opera la nucleasa y, por el otro, de una extrema cautela en su utilización. En el reciente trabajo publicado en la revista *Nature*, un grupo de investigadores dirigido por el especialista en biología reproductiva Shoukhrat Mitalipov eligió una mutación en el gen *MYBPC3* que causa miocardiopatía hipertrófica, una enfermedad hereditaria que afecta aproximadamente a 1 de cada 500 personas. En el trabajo, espermatozoides donados por un hombre portador de una mutación dominante (una delección de 4 nucleótidos) fueron utilizados para fertilizar *in vitro* ovocitos normales. Dado que el donante era un heterocigoto portador de la mutación, un 50% de sus espermatozoides llevarían la copia normal, salvaje, del gen *MYBPC3*, mientras que el otro 50% llevaría la copia mutada, generando, en ausencia de todo tratamiento, un 50% de embriones normales y un 50% de embriones portadores de la mutación. El trabajo se destacó, con respecto a intentos anteriores, por su alta eficiencia de edición, reflejada tanto en una alta tasa de corrección de la mutación como en una baja generación de embriones mosaico. La estrategia de los investigadores consistió, en primer lugar, en inyectar los componentes del sistema CRISPR/Cas9 junto con el espermatozoides, en ovocitos arrestados en metafase II (inyección intracitoplasmática de espermatozoides). Esto aumentaría la probabilidad de que la nucleasa Cas9 actúe antes de la primera duplicación del alelo paterno mutado. En segundo lugar, se eligió inyectar directamente la proteína recombinante junto con la molécula ARN guía en vez de introducir la secuencia de ADN que codifica la proteína Cas9 para permitir que ésta se fabrique en las células. De esta manera, la proteína Cas9 se encontraría activa en las células durante un período de tiempo acotado, hasta degradarse, reduciendo la exposición a la actividad de la nucleasa y, por lo tanto, la probabilidad de que se sigan generando cortes (específicos o inespecíficos) en el genoma del cigoto. En estas condiciones, se obtuvo un 72% de embriones correctamente editados, es decir un 22% de reparación precisa (vía *HDR*) y de aumento de embriones normales con respecto al 50% esperado. En el 28% de los embriones analizados, los cortes generados por Cas9 habían sido reparados por la vía *NHEJ* generando inserciones y delecciones en el gen *MYBPC3* y éstos habrían sido, por lo tanto, descartados. Un estudio exhaustivo, si bien no completo, no detectó ningún corte inespecífico no deseado por parte de la nucleasa Cas9. (15)



Limitaciones técnicas del uso de CRISPR-Cas9 en la línea germinal humana y algunas alternativas.

- Efectos "off-targets"

La especificidad es la mayor preocupación en el sistema CRISPR/Cas9, porque Cas9 puede cortar sitios que no son complementarios a la secuencia del sgRNA. Con el objeto de optimizar la predicción de los sgRNA con alta especificidad y reducir la frecuencia relativa de corte de sitios no blanco (*off-target*), se han desarrollado diversos programas informáticos que sirven como herramientas de apoyo. El principal inconveniente del uso actual del CRISPR en humanos por lo tanto, es que no conocemos con anterioridad las graves consecuencias que su empleo en embriones puedan provocar. (16)

Para abordar este problema se pueden emplear, además, numerosas estrategias como crear estructuras secundarias en sgRNA que inhiban las interacciones no-diana, modificar la longitud de los sgRNA, o modificar Cas9 para que actúe como "nickasa", de tal forma que sólo genere corte en una de las cadenas de DNA. El fundamento de la generación de Cas9 nickasas se basa en la posibilidad de desactivar uno de los dominios nucleasa de Cas9: HNH o RuvC, de tal forma que si se introducen dos nickasas, cada una con un dominio nucleasa diferente activo y, cada una asociada a una secuencia guía diferente, la región que debe ser identificada por complementariedad resulta mucho mayor y se consigue así reducir apareamientos indeseados. Otro último enfoque en la reducción off-target consiste en el estudio de los requerimientos estructurales para el reconocimiento de PAM por parte de Cas9, gracias al cual se podrá llegar a un diseño de estas proteínas con mayor especificidad. Las consecuencias de estos efectos colaterales en medicina son inaceptables. Un claro ejemplo a este respecto se puede observar en un artículo publicado en junio de este año en la revista Nature. En él se menciona la posibilidad de haber creado cientos de mutaciones fortuitas a ratones como consecuencia de su tratamiento con CRISPR. (8)

- Reacciones adversas

A fin de transportar y entregar el sistema CRISPR-Cas9 se usan vectores virales capaces de penetrar las células en grandes cantidades. Sin embargo, su uso es controvertido, debido a efectos colaterales serios, que incluyen respuestas inmunológicas importantes contra el vector o la proteína, generación de cáncer e incluso la muerte en pacientes que participaron en estudios clínicos; pero gracias a mejoras significativas en la tecnología se han reducido estos riesgos y se están consiguiendo resultados interesantes y más seguros en la clínica. Para evitar el uso de vectores virales, los componentes de CRISPR-Cas9 se pueden integrar a plásmidos.

Nuevas técnicas de transporte y entrega de CRISPR-Cas9, especialmente para introducirlo en células germinales, incluyen el uso de la ribonucleoproteína, como se ha mencionado anteriormente, que evita el uso del ADN viral o



bacteriano o de nanopartículas de lípidos, más seguras por su precisión y rápida degradación.

- **Mosaisismo**

Por otra parte, la edición del blanco puede ser limitada o incompleta; un fenómeno llamado mosaisismo, que se ha documentado en alrededor del 25 % de un grupo de cigotos humanos no viables sometidos a edición genética con CRISPR-Cas9. Para mejorar estos problemas de edición incompleta se continúan desarrollando reactivos químicos, estrategias en cultivo celular y estrategias informáticas para predecir la eficiencia de CRISPR-Cas9.

Una de las grandes inquietudes al experimentar con la edición genética de la línea germinal humana es qué tan confiable es la información que se obtendría. Estos experimentos serían muy difíciles de controlar y podría ser imposible analizar sus resultados, al menos hasta que pase un tiempo considerable (décadas, generaciones, etc.), y al tener en cuenta la incertidumbre de la conexión causal que se sucede entre la expresión genética y el papel potencial de otros factores que modifiquen los resultados biológicos en el futuro.

En general, debido al número limitado de experimentos y a las dificultades técnicas mencionadas, hasta la fecha no se recomienda el uso clínico de la edición genética en la línea germinal humana para la prevención de la transmisión de alelos causantes de enfermedad, pues todavía no se entienden sus consecuencias a largo plazo y existen alternativas seguras para que parejas portadoras de enfermedades genéticas graves puedan tener hijos sanos. (5)

Conflicto bioético

Como ha sido expuesto anteriormente las aplicaciones médicas y terapéuticas de Crispr/Cas 9 resultan verdaderamente alentadoras, no obstante, como se ha mencionado también existen argumentos en contra de la manipulación de la línea germinal: a) es imposible proporcionar el consentimiento intergeneracional; b) las consecuencias son imposibles de predecir; c) tales manipulaciones suponen una amenaza para la dignidad humana. Algunos autores se han pronunciado en contra de la modificación de la línea germinal del ADN en gametos y embriones, considerando que aún no están dadas las condiciones para garantizar la salud y la seguridad de estas aplicaciones en las generaciones futuras. La noción de "innovación responsable" (responsible research and innovation RRI) y la introducción de nuevas tecnologías para el ámbito de la salud reproductiva, demuestran una vez más sus aspectos más controversiales. Si bien la investigación con embriones humanos es un tema espinoso y que no ha sido reglamentado en muchas partes mundo (incluidos la Argentina y Chile), podría considerarse incluso que en los países donde sí está reglamentado, aún es muy pronto para iniciar investigaciones con embriones viables de buena calidad (además de que estos pueden ser considerados como un "bien escaso"). Un uso responsable implicaría contar con altas probabilidades de que la investigación arroje hallazgos valiosos. Pero, dado el limitado conocimiento actual, los resultados aún no pueden ser garantizados. (8)



El interés por la reflexión ética en torno al impacto de esta tecnología ha proliferado rápidamente, siendo el centro de atención el posible mejoramiento de los seres humanos a través de esta técnica. La búsqueda incesante de un consenso internacional entre científicos, bioéticos, sociólogos, políticos y juristas, considerando que se estarían desafiando los límites de intervención en el genoma, especialmente en la línea germinal, despierta preocupación con respecto a su uso con fines eugenésicos en el proyecto de parentalidad.

Crispr/Cas9 debería ser utilizada únicamente con el propósito de evitar el desarrollo de enfermedades o corregir desordenes genéticos. Sin embargo, a los críticos les preocupa que si la tecnología se ha desarrollado para el tratamiento de enfermedades es una pendiente resbaladiza hacia el tratamiento de características no deseadas que no son en realidad enfermedades, por ejemplo, los padres que quieran a sus hijos con ciertas características fenotípicas (como el color de los ojos, de cabello o de piel). Así mismo, podría ser utilizada para hacer niños más altos, fuertes e inteligentes. Lo que realmente alimenta los temores es la contemplación de las alteraciones genéticas que se encuentran fuera de la gama actual de la variabilidad humana. Esto puede ser simple, como la creación de colores de ojos que no existen en la actualidad, o crear súper soldados. En definitiva, se recomienda la regulación de la experimentación con esta tecnológica, para que de esta forma pueda suponer un avance para bien de la especie humana, de una forma inclusiva, y no como una nueva forma de hacer predominar un patrón racial. . (17)

En ese sentido, el descubrimiento de esta nueva tecnología puede contribuir a la construcción de disparidades sociales, como la concepción de seres humanos "diferenciados" o con alteraciones genéticas que potenciarían características consideradas extraordinarias. También es esencial destacar algunas preguntas pertinentes a los dilemas planteados, tales como: ¿cuáles serían los posibles límites a esta manipulación del genoma humano? ¿El sistema legal de los diferentes países tiene un marco legal que pueda imponer limitaciones a esta técnica de edición genética? ¿El principio de igualdad incluye un marco legal protector del respeto a las diferencias sociales? ¿Cuál sería su nivel de disponibilidad? (18)

CRISPR ha sido catalogado como una tecnología "disruptiva"; su uso ha dividido las aguas de la arena científica. Mientras que los grandes grupos abocados a la investigación de la manipulación genética de la línea germinal están de acuerdo en que la investigación básica debe continuarse; que diversos actores deben ser involucrados en la toma de las decisiones; que actualmente el uso clínico no debería realizarse; que el uso clínico debería proceder sólo si la seguridad y las cuestiones de eficacia técnica han sido resueltas y la sociedad ha acordado sus limitaciones; otros grupos sostienen que debería existir una suspensión (moratorium) en la investigación. (19)



CONCLUSIONES

1. Crispr/Cas9 constituye uno de los descubrimientos científicos más relevantes de todos los tiempos, pues ha demostrado tener el potencial para convertirse en un valioso recurso terapéutico frente a múltiples enfermedades de gran incidencia en el mundo.
2. La posibilidad que hoy existe de utilizar el sistema CRISPR/Cas9 para la edición genómica y sus múltiples aplicaciones, es el resultado de un esfuerzo colectivo y remontado a años atrás.
3. La edición genética basada en esta técnica está sujeta a una serie de limitaciones, por lo que su uso en embriones humanos no está aprobado por la Comunidad Científica.
4. El debate ético en torno a CRISPR/Cas se centra en las cuestiones relativas a la edición de células germinales, siendo su deriva no terapéutica la mayor preocupación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Fundación Instituto Roche[sede Web]. España; 2020 [11 de mayo del 2023]. Glosario de genética [1 pantalla]. Disponible en: <https://www.institutoroche.es/lafundacion/cartapresentacion>
2. Bellver V. La revolución de la edición genética mediante CRISPR-Cas 9 y los desafíos éticos y regulatorios que comporta [Internet]. 2016 [citado el 12 de mayo del 2023]; 27(2): 223-239. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=87546953009>
3. Jaulín J. CRISPR-Cas9: El futuro de la terapia génica y de la medicina personalizada CRISPR-Cas9 [Trabajo de Diploma]. Universidad de Zaragoza.
4. Nuevas tecnologías en agricultura, medio ambiente y alimentación [sede Web]. Universidad de Alicante y Real Academia de Ciencias: Fundación Antama; 2021 [acceso el 12 de mayo del 2022]. Francis Mojica explica cómo fue el descubrimiento del sistema CRISPR [1 pantalla]. Disponible en: <https://fundacion-antama.org/francis-mojica-explica-como-fue-el-descubrimiento-del-sistema-crispr/#:~:text=Francis%20Mojica%20explic%C3%B3%20que%20en,mu y%20cerca%20de%20las%20otras.>
5. Gómez-Tatay L, Mejías I. Con el descubrimiento de CRISPR/Cas9, la edición genética ha llegado para quedarse [Internet]. 2017 [citado el 13 de mayo del 2022]. Disponible en: https://www.bioeticacs.org/iceb/seleccion_temas/genomica/Con_el_descubrimiento_de_CRISPR.pdf
6. Glorio, R. El sistema "CRISPR/Cas9" en la edición del genoma [Internet]. (2018). [citado el 13 de mayo del 2023]. Disponible en: https://www.researchgate.net/profile/Roberto-Glorio/publication/326654743_El_sistema_CRISPR_Cas9_en_la_edicion_d el_genoma/links/5b5b170ca6fdccf0b2fa66dd/El-sistema-CRISPR-Cas9-en-la-edicion-del-genoma.pdf



7. Artigas R, Díaz M, Rodríguez R, Soca P. Principios y aplicaciones médicas de la edición de genes mediante CRISPR/Cas [Internet]. 2021 [citado el 9 de mayo del 2023]; 19 (6): 1-8. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1727-897X2021000601005#:~:text=La%20tecnolog%C3%ADa%20CRISPR%2FCas%20m%C3%A1s,a%20virus%20y%20pl%C3%A1smidos%20invasores.&text=Al%20integrar%20en%20su%20genoma,celular%20de%20los%20invasores%20anteriores
8. Sanz T. CRISPR/Cas9 como herramienta natural de edición genética y su aplicación en el tratamiento inmunológico del cáncer [Trabajo de Diploma]. Facultad de Farmacia Universidad complutense.
9. Lima NS, Gustavo Martínez A, Soberón MV, Plaza MIC. Perspectivas de la edición genética (CRISPR/Cas9) [Internet]. Gov.ar. [citado el 20 de mayo de 2023]. Disponible en: https://ri.conicet.gov.ar/bitstream/handle/11336/103956/CONICET_Digital_Nro.c5f543f1-4a67-45cb-9c40-d3d5fff252f0_A.pdf?sequence=2&isAllowed=y
10. Quintana D. ¿SE PUEDE APLICAR EL SISTEMA CRISPR-Cas9 EN INMUNOTERAPIA? [Internet] 2019 [citado el 13 de mayo del 2022]. Disponible en: <https://riull.ull.es/xmlui/bitstream/handle/915/17532/%C2%BFSe%20puede%20aplicar%20el%20sistema%20CRISPR-Cas9%20en%20inmunoterapia.pdf?sequence=1#:~:text=El%20sistema%20CRISPR%2DCas9%20es,completa%20seguridad%20de%20la%20tecnolog%C3%ADa.>
11. Guzmán-Serrano C, Gutiérrez S, Hernández C, Londoño-Velasco E. Avances del CRISPR/CAS en relación con su aplicación en cáncer colorrectal [Internet]. 2022 [citado el 12 de mayo del 2022]; 63(2). Disponible en: <https://revistas.javeriana.edu.co/index.php/vnimedica/article/view/36183/28417>
12. Canet D, Olivares I. Crispr-Cas9: Técnicas y Aplicaciones [Internet]. 2017 [citado el 13 de mayo del 2022]. Disponible en: <https://openaccess.uoc.edu/bitstream/10609/63825/6/dacalo4TFM0617memoria.pdf>
13. La diabetes NHPE. Células madre y edición del genoma: [Internet]. Revistadiabetes.org. [citado el 15 de mayo]. Disponible en: <https://www.revistadiabetes.org/wp-content/uploads/Celulas-madre-y-edicion-del-genoma-nuevas-herramientas-para-entender-la-diabetes.pdf>
14. Gomez S. Aplicaciones del sistema CRISPR/Cas9 en las enfermedades de Alzheimer, Parkinson y Huntington [Tesis]. Puebla (Mexico); 2022.
15. Giono L. CRISPR/Cas9 y la terapia génica [Internet]. 2017 [citado el 14 de mayo del 2022]. Disponible en: http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0025-76802017000500009
16. Toca SL. La revolución del CRISPR. Revista de Derecho, Empresa y Sociedad (REDS) [Internet]. 2019 [citado el 17 de mayo del 2023]; (14):65–8.



Available

from:

<https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=7219562>

17. Suarce M, Suárez M, Suárez H, Urdaneta A, Urribarri E, Vicci, C. Aspectos científicos y bioéticos de la utilización del sistema CRISPR/CAS9 en la manipulación genética en humanos [Internet]. 2020 [citado el 17 de mayo del 2023]; 7(18): 87-94. Disponible en: <https://www.produccioncientificaluz.org/index.php/rluz/article/view/30930>
18. Félix C, Valenca C, Rocha de Morales J. La protección de la diversidad en el patrimonio genético: implicaciones bioéticas y jurídicas en el uso de CRISPR-Cas9 como herramienta de edición genómica en humanos [Internet] 2020 [citado el 17 de mayo del 2023]; (49). Disponible en: https://scielo.isciii.es/scielo.php?pid=S1886-58872020000200006&script=sci_arttext&tlng=pt
19. Lima N.S. CRISPR/Cas9: reflexiones bioéticas sobre las modificaciones genómicas [Internet]. 2018 [citado el 16 de mayo del 2023]; 29 (1). Disponible en: http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1852-62332018000100001

Los autores certifican la autenticidad de la autoría declarada, así como la originalidad del texto. Además, se deberá hacer referencia a las fortalezas y debilidades de los estudios así como a la existencia o no de conflictos de intereses.