

CRISPR/Cas9: La técnica que reescribió la historia

Gerardo Rangel Sánchez

grangel@institutogestalt.edu.mx

Instituto Gestalt

Diego Iñaki Barrón Palmeros

diegob333@hotmail.com

Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Una historia de cambio

La palabra CRISPR, es un acrónimo en inglés (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats*) referido a repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas, nombre que es asociado a una técnica de edición genética sumamente interesante que está revolucionando la biología. El fenómeno soñado de poder modificar el ADN comenzó en 1987 tras publicarse un estudio en el cual se observó cómo algunas bacterias, en concreto las de la especie *Streptococcus pyogenes*, eran capaces de defenderse de los virus destruyendo su material genético. Sin embargo, fue en el año 2005 cuando el microbiólogo español Francisco Juan Martínez Mojica, de la Universidad de Alicante, junto a su equipo de investigación, observó que en la cadena de ADN de estas bacterias existían zonas concretas que contenían varias secuencias de ADN que se repetían y se podían leer de igual manera al derecho y al revés, y que, además, entre secuencia y secuencia se encontraban fragmentos de ADN vírico.

Estas bacterias sorprendentemente contenían en su ADN, material genético de los propios virus invasores. ¿Pero para qué?, ¿de dónde salía este ADN foráneo? Poco a poco se fue descubriendo la respuesta, y se demostró que cuando un virus ataca a una de estas bacterias, inserta en ellas su material genético, para aprovecharse de la propia maquinaria celular con el propósito de replicar miles y miles de copias de su ADN viral. Estas copias posteriormente servirán para producir nuevas partículas virales buscando infectar a otras células bacterianas. Sin embargo, cuando la bacteria logra sobrevivir al ataque del virus, esta toma un fragmento del ADN del virus y lo guarda en su propio ADN, lo cual, básicamente es como si se almacenara la identidad genética del virus, resguardando repetidamente estas secuencias. Dichas secuencias genéticas repetitivas, y almacenadas entre la colección de genes bacterianos son las *Repeticiones Poliéndricas Cortas Agrupadas y Regularmente Espaciadas* o CRISPR (Hsu, *et al.*, 2014).

Posterior a lo anterior, un grupo de investigación, liderado por el investigador Alexander Bolotin, en Francia, descubre el sistema de proteínas Cas9 (enzimas tipo endonucleasas capaz de cortar sitios específicos de ADN), que acompaña a

CRISPR. La participación de estas proteínas se siguió investigando por años, hasta que, en 2012, otro grupo de científicos dirigido por Emmanuelle Charpentier de la Universidad de Umea y Jennifer Doudna de la Universidad de California en Bekerley, publicaron conjuntamente un artículo donde proponía utilizar esta maquinaria de las bacterias como herramientas de edición genética. Consiguieron programar este sistema CRISPR para que la proteína Cas 9, reconociera y recortara ya no el ADN vírico, sino un fragmento de ADN humano a voluntad, es decir, cualquiera secuencia que quisiéramos.

La revolución de esto vino cuando los científicos se dieron cuenta que el sistema era programable: Es decir, se podía proporcionar una copia del ADN que se quisiera modificar y posteriormente colocarlo en una célula viva para que actuara. Pero ¿cómo se hace eso? Lo primero, es que se necesita conocer con precisión el fragmento o ADN que se desee editar o modificar. De este modo, hará falta diseñar un fragmento de ARN que sea complementario a esta secuencia, es decir, que sea capaz de reconocerla y unirse a ella, tal como hacía la bacteria. Así, este ARN guiará al complejo CRISPR-Cas9 (formado por el ARN + la proteína Cas9) hasta la secuencia de ADN complementaria para unirse a ella, logrando que la Cas9 corte en un sitio específico para remover dicho fragmento (**Figura 1**).

Por lo tanto, podemos decir que las bacterias utilizan estas secuencias como si fueran un arsenal molecular a fin de defenderse del ataque de un nuevo virus. Así, cuando un nuevo virus se dispone atacar de nuevo a la bacteria, esta recurrirá al ADN vírico que se había guardado en su biblioteca genética, para producir una molécula intermediaria de ARNm que culminara en la síntesis de la proteína Cas9, una pieza fundamental en la implementación de un plan de resistencia contra estas invasiones virales.

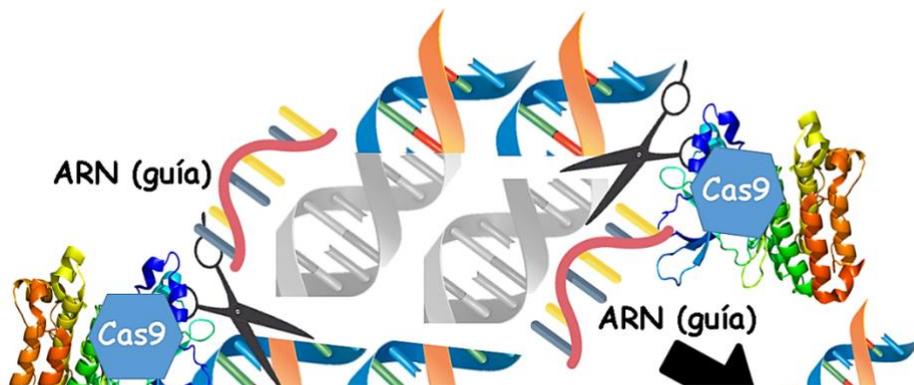


Figura 1. Estructura del complejo CRISPR/Cas9. El proceso de editar un genoma con CRISPR/Cas9 incluye dos etapas. En la primera etapa el ARN guía se asocia con la enzima Cas9. En la segunda etapa la endonucleasa Cas 9 corta el

ADN de interés. Básicamente podemos decir que el ARN guía actúa como un perro lazarillo llevando a Cas9 (el ejecutor), al sitio donde ha de realizar la función de edición o corte de la secuencia de ADN.

Al estilo Sherlock Holmes, las Cas9 se dedica a rastrear por toda la célula, buscando una cadena de ADN que sea complementaria a este ARN intermediario. Cuando se encuentra con el material genético del nuevo virus, las cadenas de ARN y ADN se van a juntar y la proteína Cas9 se activará y cortará el ADN vírico, dejándolo así totalmente inútil, KO, quedando a salvo del ataque. Por eso CRISPR (o CRISPR/Cas9) se dice que actúa como unas “tijeras moleculares” (**Figura 1**).

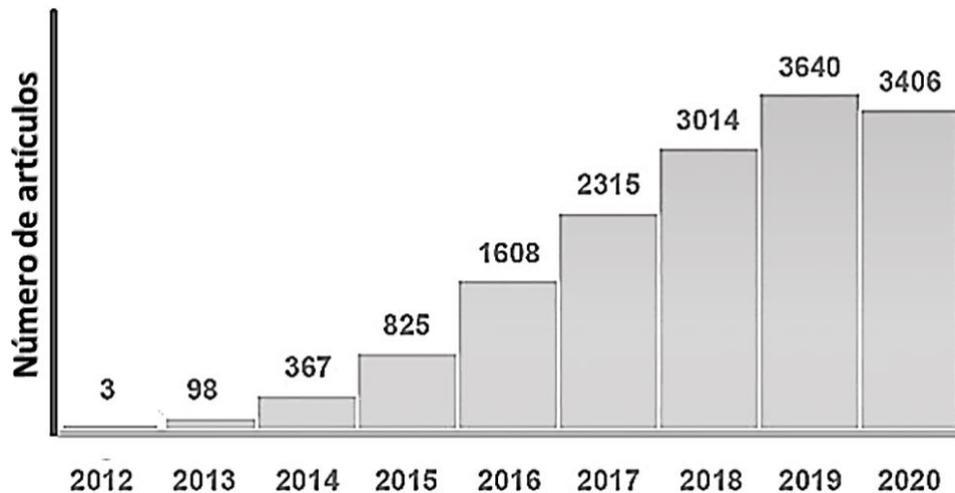
Siendo así, una vez cortada la cadena de ADN pueden pasar dos cosas: Primero, la célula intentará reparar el error; pero este proceso de reparación es muy propenso a errores, de modo que es común que se produzcan mutaciones que deshabiliten el gen. Esto es lo que hace que CRISPR sea una herramienta interesante para eliminar genes específicos. No obstante, también se puede modificar el CRISPR para que nos permita editar el genoma, es decir, no solo cortar la cadena de interés, sino modificarla introduciendo otra secuencia distinta para sustituirla. Esta técnica abre la posibilidad de editar de manera específica el código genético, y por tanto, de cambiar la información contenida en el genoma humano o el genoma de cualquier otra especie de interés médico.

Rompiendo los esquemas: Impacto de CRISPR/Cas9

A partir del descubrimiento y su publicación formal en el mundo de la ciencia, la técnica CRISPR/Cas9, ha sido ampliamente utilizada en sectores como la agricultura, la medicina o la biotecnología. Por ejemplo, uno de sus principales usos se ha dirigido hacia el tratamiento de enfermedades como el cáncer, o padecimientos hereditarios como la distrofia muscular de Duchenne, la fibrosis quística, beta talasemia, anemia falciforme, hemofilia y la enfermedad de Huntington, entre otras (Aragón, *et al.* 2020).

Utilizando esta metodología se han generado grupos de líneas celulares experimentales, así como, modelos genéticos con varias especies de animales a los cuales se les ha podido inducir, ya sea mutaciones o eliminación de genes interés con el fin de corregir o combatir diversas enfermedades. Esto ha permitido abrir una brecha favorable para erradicar enfermedades monogénicas (es decir, aquellas en las que sólo un gen involucrado) o multigénicas (en las que hay más de un gen implícito). Sin embargo, como en muchas otras cosas, existen limitaciones en la aplicación de esta nueva tecnología, ya que se ha observado que este sistema no es totalmente exacto, es decir, existe evidencia de que la nucleasa Cas9 puede realizar cortes inespecíficos en regiones diferentes a la que se desea modificar, lo

cual puede causar cambios en genes cercanos modificando regiones clave de regulación génica del metabolismo de la célula o de los individuos. Ante ello, en distintos laboratorios de interés alrededor del mundo, hoy en día se están explorando nuevas estrategias para disminuir el riesgo de la inespecificidad de Cas9, para hacerla aún más confiable. Evidencia de ello, es la creciente cantidad de artículos que se han generado sobre esta y otras líneas de investigación relacionadas con este sistema CRISPR/Cas9 (Jao y Chen, 2013).



Artículos científicos relacionados con CRISPR/Cas9. La gráfica fue obtenida al hacer la búsqueda en PubMed con las palabras “CRISPR Cas9” (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=crispr+cas9>), el 28 de octubre de 2020. El total de publicaciones encontradas es mayor a 15308. Se presentan los datos a partir del año 2012 cuando se realizó la primera publicación sobre CRISPR/Cas9 como una herramienta de molecular manipulable en laboratorio con el fin de realizar modificaciones genéticas (Modificado de Aragón, *et al.* 2020).

Por todo lo anterior, podemos subrayar que ha sido tal el impacto en la implementación de esta técnica que la Real Academia de las Ciencias de Suecia, decidió galardonar con el premio Nobel de Química a las científicas Emmanuelle Charpentier y Jennifer Doudna en el año 2020, por haber desarrollado el método para edición genética más novedoso en toda la historia de la genética (**Figura 3**).



Figura 3. Premio Nobel de Química 2020. El miércoles 07 de octubre de 2020, la Academia de Ciencias de Suecia anunció que las científicas Emmanuelle Charpentier (izquierda) y Jennifer A. Doudna (derecha), habían sido las ganadoras del Premio Nobel de Química de ese año "por el desarrollo de un método para la edición del genoma" (Modificado de Pulido, 2020).

Lucha de gigantes: El dilema ético-científico

Otra cuestión es que todas las academias científicas del mundo han desaprobado de manera enfática, la generación de humanos genéticamente modificados, principalmente por cuestiones éticas universales, además de de equidad al acceso de esta tecnología, la falta de consentimiento de posibles humanos nacidos con modificaciones genéticas -que quizás no hubieran deseado tener-, y en general, por los efectos secundarios clínicos que podrían generarse en dichos individuos. Por ejemplo, en el año 2018, nacieron en China unas gemelas cuyos embriones fueron modificados genéticamente para conferirles resistencia al VIH (virus de inmunodeficiencia humana), el virus responsable de provocar la enfermedad del SIDA. Los investigadores que hicieron el tratamiento de los embriones, liderados por el científico chino He Jiankui, justificaron sus acciones argumentando que era una estrategia modelo que buscaba establecer un eficiente sistema de prevención contra el SIDA, pero, el resto de la comunidad científica no lo vio como un claro ejemplo de mejoramiento genético, sino todo lo contrario, que además fue realizado sin tener en cuenta los posibles efectos secundarios, y sin siquiera calcular los riesgos que podría tener dicho experimento (**Figura 4**).

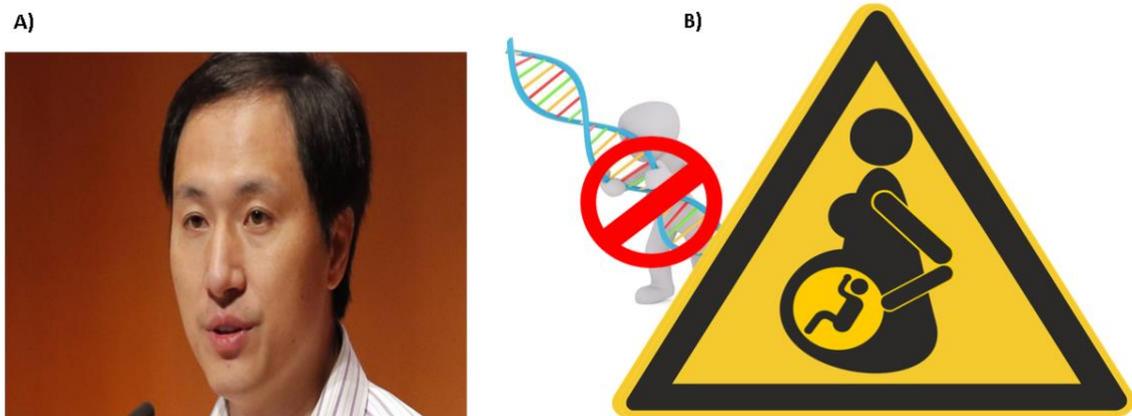


Figura 4. Condena contra la modificación genética de embriones humanos. (A) He Jiankui, un científico chino acusado en 2018 de editar de forma ilegal genes de embriones humanos con fines reproductivos. En su país, 122 científicos publicaron una declaración conjunta en la que afirmaban que “cualquier intento” de hacer cambios en embriones humanos mediante modificaciones genéticas era “una locura” y que el nacimiento de estos bebés representaba “un alto riesgo”. (B) Imagen alusiva a la no experimentación y edición génica en embriones humano.

La condena no sólo provino de parte de la comunidad científica, sino también de las autoridades, ya que los investigadores involucrados recibieron una pena de tres años de cárcel por parte del gobierno chino. Hoy en día todos los expertos coinciden que dicho experimento fue completamente irresponsable y prematuro. Sin embargo, para otro sector, representa un ambiguo camino hacia el futuro en el mejoramiento genético, una nave sin boleto de regreso hacia la modificación genética en humanos dentro de un universo donde el límite lo marcaremos nosotros mismos. Todo es cuestión de análisis y objetividades, como diría la propia Jennifer Doudna, quien declaró en una conferencia TED celebrada en 2013... “—es necesario que las instituciones y los científicos hagan una pausa para discutir las implicaciones bioéticas de esta tecnología—”.

Referencias

Aragón, J., Bermudez, M.R. y Montañez, C. (2020, 19 de diciembre). *Premio Nobel 2020 a la tijera molecular: CRISPR/Cas9*. Revista Avance y Perspectiva. <https://avanceyperspectiva.cinvestav.mx/premio-nobel-2020-a-la-tijera-molecular-crispr-cas9/>

- Hsu, P.D., Lander, E.S. and Zhang, F. (2014). Development and Applications of CRISPR-Cas9 for Genome Engineering. *Cell*, 157(6),1262-1278. <https://doi.org/10.1016%2Fj.cell.2014.05.010>
- Jao, L.E., Wente, S.R. and Chen, W. (2013). Efficient multiplex biallelic zebrafish genome editing using a CRISPR nuclease system. *Proc Natl Acad Sci USA*, 110(34),13904-13909. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.05.010>
- Pulido, S. (2020, 07 de octubre). *Premio Nobel de Química 2020 para las creadoras de la técnica CRISPR/Cas9*. Revista Gaceta Médica. <https://gacetamedica.com/investigacion/premio-nobel-de-quimica-2020-para-las-creadoras-de-la-tecnica-crispr-cas9/#:~:text=Premio%20Nobel%20de%20Qu%C3%ADmica%202020,de%20la%20t%C3%A9cnica%20CRISPR%2FCas9&text=El%20Premio%20Nobel%20de%20Qu%C3%ADmica,como%20la%20tecnolog%C3%ADa%20CRISPR%20%2F%20Cas9.>