

Francisco Alejandro Lagunas Rangel

Sistema CRISPR/Cas

Hace mucho tiempo atrás los investigadores se plantearon el objetivo de desarrollar formas eficientes para realizar cambios precisos en el genoma de las células. Recientemente, una herramienta conocida como CRISPR/Cas ha revolucionado los procesos de edición genética —probablemente debido a su simplicidad, alta eficiencia y versatilidad— y ha contribuido al avance de la ciencia.

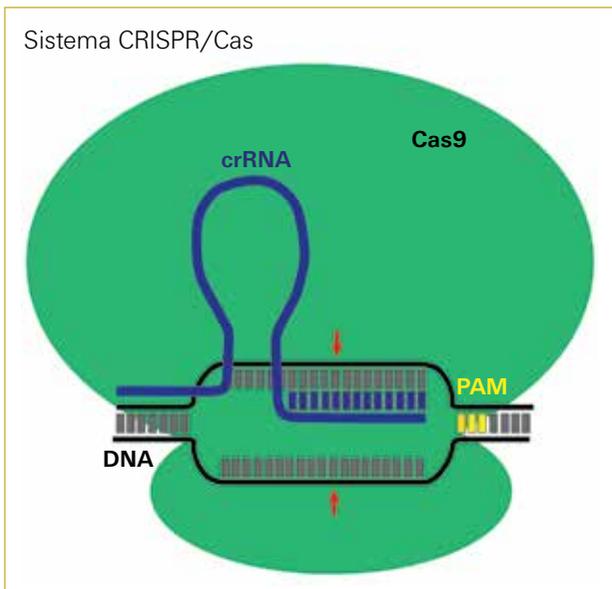


Figura 1. El sistema CRISPR/Cas involucra un crRNA maduro unido a la proteína Cas, lo cual conforma un complejo que reconoce a los ácidos nucleicos extraños y destruye las secuencias complementarias gracias a su actividad de corte (flechas rojas). La secuencia PAM se señala en amarillo.

¿Qué es el sistema CRISPR/Cas?

El sistema CRISPR/Cas involucra un **complejo enzimático** guiado por una secuencia de ácido ribonucleico (ARN) (véase la Figura 1), el cual se considera parte de los mecanismos de defensa (inmunidad) que usan las bacterias y las **arqueas** para evitar la invasión por un ácido desoxirribonucleico (ADN) extraño. Sería algo similar a unas tijeras capaces de cortar de una manera muy precisa y totalmente controlada cualquier molécula de ADN.

En general, el sistema CRISPR/Cas funciona en tres etapas para desarrollar una respuesta inmune completa. En la primera, pequeños fragmentos de ADN derivados de los virus (bacteriófagos) o plásmidos invasores se

incorporan cerca de una zona del genoma bacteriano con una gran cantidad de **secuencias palindrómicas** cortas agrupadas y regularmente interespaciadas (CRISPR, por sus siglas en inglés), las cuales, en la segunda etapa, se transcriben y gene-

Complejo enzimático

Grupo de biomoléculas que trabajan en conjunto para catalizar las reacciones químicas.

Arqueas

Microorganismos muy parecidos a las bacterias, pero con una historia evolutiva independiente y diferencias en su metabolismo.

Secuencias palindrómicas

Secuencias que se leen de la misma manera en ambas direcciones.



ARN no codificante
Que no se traduce en una proteína.

ran un **ARN no codificante** largo, denominado ARN CRISPR (pre-crRNA, por sus siglas en inglés), el cual se procesa mediante unas proteínas conocidas como Cas (siglas en inglés de sistema asociado a CRISPR) y otros factores del huésped para producir crRNA cortos y maduros. Finalmente, el crRNA maduro se ensambla con la proteína Cas y forma un complejo que reconoce a los ácidos nucleicos extraños y destruye las secuencias complementarias al segmento incorporado mediante la actividad endonucleolítica (de corte) de las enzimas Cas, con lo cual protege a la célula de futuras intrusiones del mismo invasor (véase la Figura 2).

De manera notable, una pequeña secuencia conservada y ubicada cerca de la secuencia blanco del crRNA en el ADN invasor, conocida como PAM, desempeña un papel esencial en la selección y degradación del ADN objetivo en la mayoría de los sistemas

CRISPR/Cas. Si el crRNA no es complementario, Cas se libera y busca otro sitio PAM. Además, debido a que existe una gran diversidad de elementos genéticos invasores, las bacterias que cuentan con este sistema han creado distintos tipos de enzimas Cas para responder a un gran número de ellos, las cuales, además de la actividad de corte, poseen otras funciones auxiliares específicas de cada tipo.

¿Cómo se identificó el sistema CRISPR/Cas?

Las secuencias repetidas que posteriormente se conocerían como CRISPR fueron identificadas por primera vez por un grupo de científicos japoneses en 1987, particularmente en la bacteria *Streptococcus pyogenes*. Años más tarde, de forma independiente, el científico Francisco J. M. Mojica las encontraría dentro del genoma de diferentes bacterias, arqueas y

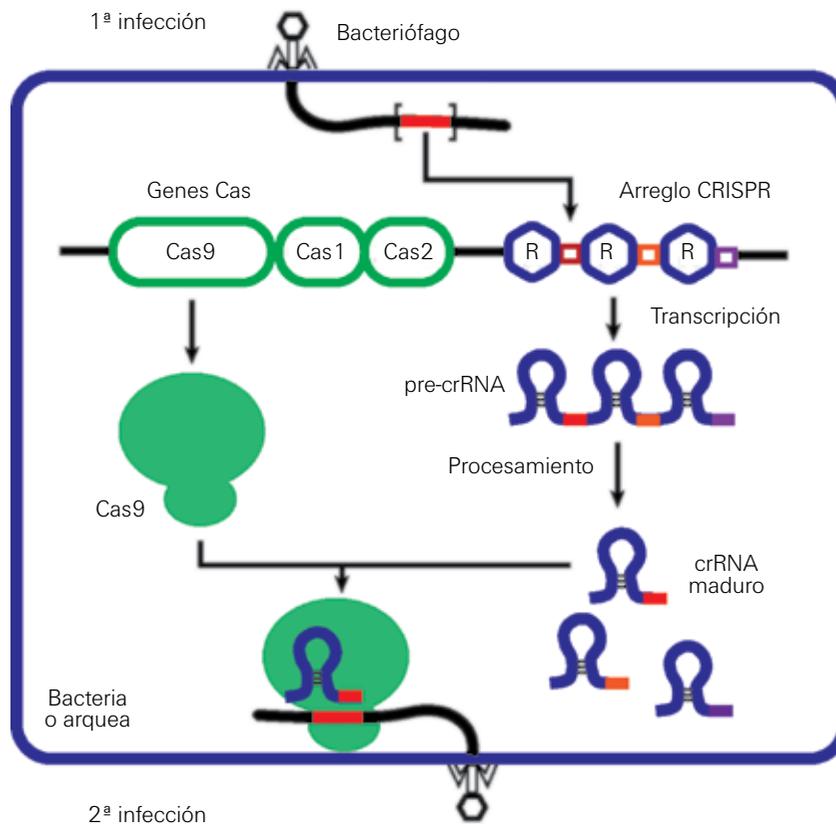


Figura 2. Inmunidad propiciada por el sistema CRISPR/Cas en bacterias. El sistema funciona en tres etapas. En la primera, un ADN derivado de un virus o plásmido invasor se incorpora entre los repetidos (R), conocidos como CRISPR. En la segunda etapa, se genera un ARN no codificante largo (pre-crRNA), que se procesa. Finalmente, se ensambla el crRNA maduro con la proteína Cas, protegiendo así a la célula huésped de futuras infecciones.

mitocondrias de eucariontes, y acuñaría el nombre de CRISPR para este tipo de secuencias. Además, en la misma publicación se describió por primera vez un conjunto de genes que codificaban nucleasas y se asociaban a las secuencias repetidas CRISPR (los genes Cas).

Conforme avanzó la investigación, se fue confirmando que las secuencias espaciadoras CRISPR, en conjunto con los genes Cas, podían proporcionar inmunidad celular contra la infección por fagos y plásmidos. Jennifer Doudna y Emmanuelle Charpentier demostraron que algunas secuencias específicas de ARN podían guiar al sistema CRISPR/Cas y resaltaron su potencial como herramienta de **edición genética**, en especial, mediante el uso de la variante Cas9. Así, en 2012 se utilizó por primera vez el sistema CRISPR/Cas como una herramienta de ingeniería genética en cultivos de células humanas y desde entonces se ha utilizado en muchos organismos, incluida la levadura del pan, el pez cebra, la mosca de la fruta y algunos gusanos, plantas, ratas y ratones, entre muchos otros modelos de investigación.

¿Para qué sirve el sistema CRISPR/Cas en la investigación actual?

Debido a la capacidad del sistema CRISPR/Cas de integrar un ADN externo y guiar un corte en un sitio muy específico, esta herramienta se utilizó para desarrollar una técnica de edición genética que hoy día es una de las más populares, gracias a su facilidad de

diseño, simplicidad de uso y alta eficiencia, lo cual permite una gran cantidad de aplicaciones. Al cambiar la secuencia guía del ARN en el crRNA, este sistema se puede programar para apuntar hacia prácticamente cualquier secuencia de ADN de interés en el genoma y generar una ruptura de doble cadena. Ésta, al ser reparada, y dependiendo el mecanismo utilizado, puede hacer que se inserten o eliminen secuencias aleatorias, para provocar mutaciones o reemplazar una secuencia. Por lo tanto, el sistema CRISPR/Cas proporciona una plataforma poderosa para la edición del genoma, que incluye el silenciamiento o la eliminación de genes, mutagénesis y correcciones de secuencias específicas.

Además, mediante modificaciones recientes del sistema, como cambios en la proteína Cas para eliminar su capacidad de cortar, pero no de unirse al ADN, también se ha permitido actuar en la transcripción de los genes como obstáculo para la maquinaria transcripcional, modificando con ello su nivel de expresión. Igualmente, su acoplamiento con ciertas enzimas permite introducir **modificaciones epigenéticas** para no cambiar la información genética, pero sí su accesibilidad o disponibilidad para la maquinaria transcripcional. El sistema CRISPR/Cas ofrece simplicidad y eficacia en prácticamente todos los tipos de células en animales de interés médico, plantas y especies de ganado relevantes para la alimentación y la agricultura, así como organismos modelo ampliamente utilizados por la comunidad científica (véase la Figura 3).

Edición genética

Proceso mediante el cual una secuencia de ADN es insertada, eliminada, reemplazada o modificada en el genoma de un organismo.

Modificación epigenética

Cambios en la expresión de genes, que no obedecen a una alteración de la secuencia del ADN y que son hereditarios. Implican alteraciones químicas en el ADN y en la estructura y condensación de la cromatina.

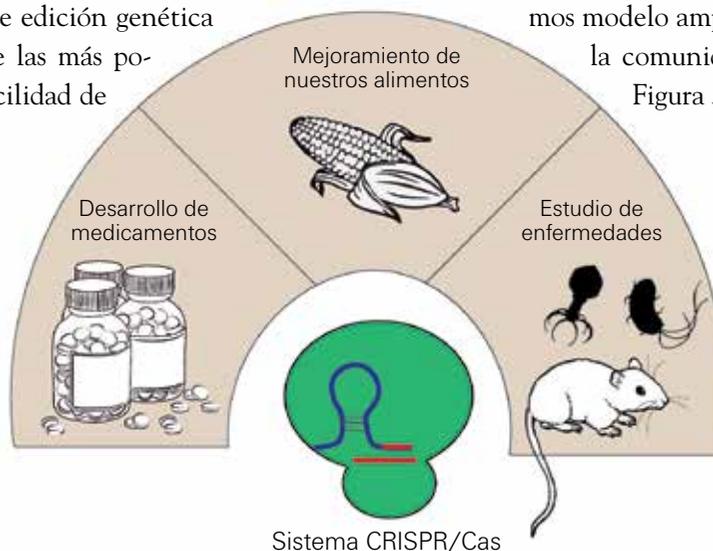


Figura 3. Aplicaciones del sistema CRISPR/Cas.



■ **¿Cuáles son las aplicaciones del sistema CRISPR/Cas?**

■ En medicina, la edición del genoma es de gran interés para la prevención y el tratamiento de diversas enfermedades. Actualmente, con el sistema CRISPR/Cas se está explorando una amplia variedad de padecimientos, incluidos los trastornos de un solo gen, como la fibrosis quística, la hemofilia y la enfermedad de células falciformes (con forma de media luna). Éste también es prometedor para el tratamiento y la prevención de afecciones más complejas, como el cáncer, los padecimientos cardíacos, las enfermedades mentales y la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).

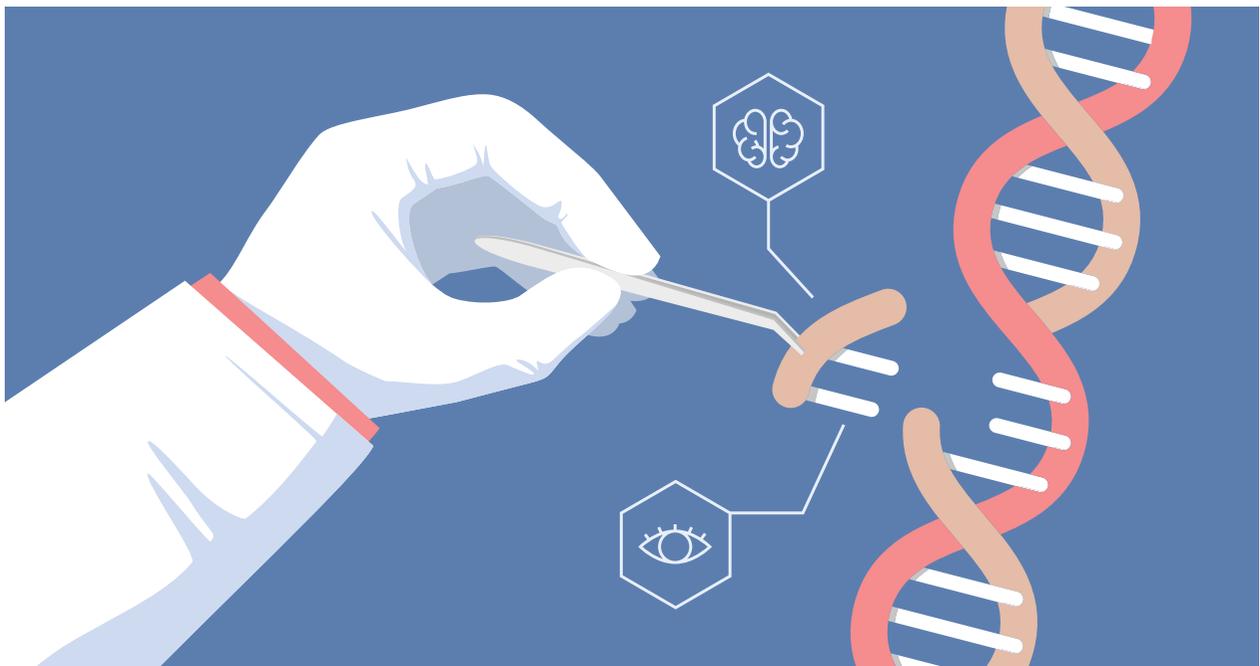
Con el sistema CRISPR/Cas se han modificado genéticamente ciertos mosquitos para que no puedan transmitir la malaria; también se ha experimentado en cerdos para que sus tejidos sean compatibles con los del ser humano; asimismo, se ha utilizado en bacterias para la identificación de cepas y para estudiar los mecanismos y genes relacionados con la resistencia a los antibióticos.

Además de estas implicaciones médicas, el sistema CRISPR/Cas también se puede utilizar para mejorar los alimentos que consumimos y modificar las bacterias y otros microorganismos de uso industrial y

alimentario. El sistema CRISPR/Cas se ha implementado para luchar contra las enfermedades que atacan a las plantas y los animales de los que nos alimentamos, lo cual conlleva reducir el uso de fertilizantes, fitosanitarios y hormonas, e incluso mejorarlos para que su consumo pueda resultar más benéfico. Otro ejemplo importante es en *S. thermophilus*, una bacteria muy utilizada en la elaboración de quesos y yogur, la cual se modificó para protegerla de los virus que pudieran dañarla, y así asegurar su producción o incluso aumentarla.

■ **¿Qué más se puede hacer con el sistema CRISPR/Cas?**

■ Más allá de la edición del genoma, el impacto del sistema CRISPR/Cas se extiende al control genómico específico, en el que está incluida la regulación tanto transcripcional como epigenética. Particularmente, las variantes desactivadas de Cas9 (dCas9) que carecen de la función de corte, aunque se unen a una secuencia específica del ADN, permiten regular de forma precisa la expresión transcripcional de un gen. Además, cuando se fusionan con un represor transcripcional o un activador, las quimeras dCas9 pueden reducir o aumentar la expresión génica, res-



pectivamente. Del mismo modo, por fusión a fluoróforos (proteínas coloridas), dCas9 permite la visualización y el aislamiento específico de una secuencia de ADN y la imagen dinámica de cromatina.

■ **Consideraciones éticas**

■ Con la aparición de la tecnología CRISPR/Cas, la edición dirigida de una amplia variedad de genomas ya no es una hipótesis, sino una realidad que se produce con regularidad. A medida que los ámbitos de aplicación van más allá de la investigación y las terapias biomédicas, en la comunidad global abundan las preocupaciones éticas en torno al uso apropiado de esta herramienta.

Una de las principales controversias que se refieren al sistema CRISPR/Cas surge de su posible aplicación en embriones humanos. Esta discusión se debe en gran parte a la falta de claridad respecto del estado del embrión en la investigación. ¿La entidad es simplemente una bola de células o tiene estatus de persona completa? Incluso si está justificada, el embrión como tal no puede dar su consentimiento en el momento de la investigación, ya que la entidad no está lo suficientemente desarrollada; pero cabe considerar que a partir de la investigación podría experimentar consecuencias, buenas o malas, que pueden extenderse a lo largo de su vida y a las generaciones futuras. En este tenor, un científico chino llamado He Jiankui sorprendió al mundo en noviembre de 2018 cuando informó que había creado los primeros bebés editados genéticamente con el sistema CRISPR/Cas, aunque, lamentablemente, dejó de lado las consideraciones éticas y utilizó métodos de edición de genes potencialmente inseguros e ineficaces en los niños. Con ello propició la preocupación de la comunidad global respecto a que muchas más aplicaciones peligrosas de esta herramienta podrían surgir o que incluso se estén desarrollando.

■ **Conclusiones**

■ El sistema CRISPR/Cas es una herramienta prometedora que en los últimos años ha revolucionado la

ciencia y la tecnología de todo el mundo, aunque todavía quede mucho por saber y por hacer. Su descubrimiento como sistema de protección de bacterias contra los virus o plásmidos externos y su implementación como herramienta de edición genética han permitido grandes avances en la biología, medicina y biotecnología. Actualmente se realizan múltiples investigaciones que utilizan esta herramienta con el fin de estudiar diferentes enfermedades, desarrollar medicamentos y mejorar la calidad de los alimentos que consumimos, entre muchas otras aplicaciones. Sin embargo, no hay que dejar de lado que, al mismo tiempo, la popularidad del sistema ha dado lugar a preocupaciones éticas respecto de su uso y aplicación apropiada.

Francisco Alejandro Lagunas Rangel

Departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.

francisco.lagunas@cinvestav.mx

Lecturas recomendadas

- Amitai, G. y R. Sorek (2016), "CRISPR-Cas adaptation: insights into the mechanism of action", *Nat Rev Microbiol*, 14(2):67-76. doi:10.1038/nrmicro.2015.14.
- Barrangou, R. y J. A. Doudna (2016), "Applications of CRISPR technologies in research and beyond", *Nat Biotechnol*, 34(9):933-941. doi:10.1038/nbt.3659.
- Chen, J. S. y J. A. Doudna (2017), "The chemistry of Cas9 and its CRISPR colleagues", *Nat Rev Chem*, 1(10):78. doi:10.1038/s41570-017-0078.
- Cyranoski, D. (2018), "CRISPR-baby scientist fails to satisfy critics", *Nature*, 564(7734):13-14. doi:10.1038/d41586-018-07573-w.
- Jiang, F. y J. A. Doudna (2017), "CRISPR-Cas9 Structures and Mechanisms", *Annu Rev Biophys*, 46(1):505-529. doi:10.1146/annurev-biophys-062215-010822.
- Molla, K. A. y Y. Yang (2019), "CRISPR/Cas-Mediated Base Editing: Technical Considerations and Practical Applications", *Trends Biotechnol*, 37(10):1121-1142. doi:10.1016/j.tibtech.2019.03.008.