



TEMA 2017: CRISPR-Cas: Utilidad clínica de la edición genómica como opción terapéutica



Hospital San Juan de Dios, San José, Costa Rica. Fundado en 1845

**ISSN
2215-
2741**

Recibido: 26/11/2017
Aceptado: 15/12/2017

David Gutiérrez-Albenda, MD¹
Lizbeth Salazar-Sánchez, MD-PhD²

¹Docente Departamento de Anatomía, Escuela de Medicina Universidad de Costa Rica. Estudiante Programa de Posgrado en Ciencias Médicas Universidad de Costa Rica.

Correo electrónico: david.gutierrezalbenda@ucr.ac.cr

²Directora Escuela de Medicina Universidad de Costa Rica. Directora Programa de Posgrado en Ciencias Médicas Universidad de Costa Rica. Profesora Catedrática Universidad de Costa Rica.

Correo electrónico: lizabeth.salazarsanchez@ucr.ac.cr

RESUMEN

El estudio del papel del origen genómico de diversas patologías, entre las cuales podemos citar algunos tipos de cáncer, enfermedades neurodegenerativas y otras, ha abierto la posibilidad de terapias basadas en la edición genómica, técnicas propias de la biología molecular. La principal herramienta de este tipo es la basada en sistemas CRISPR-Cas, cuya implementación en los campos de la terapéutica, promete avances de índole curativa, ya sea actuando sobre la edición de alteraciones o deficiencias de origen genómico o de la programación de respuestas del sistema inmune adecuadas a un tipo de patología.

PALABRAS CLAVE

Sistemas CRISPR-Cas; biología molecular; edición de genes; utilidad clínica; nucleasa cas

ABSTRACT

The study of the role that genomic origin plays on different pathologies, among which we can mention some types of cancer, neurodegenerative diseases and others, has opened the possibility for therapies based on genomic editing, techniques that are proper of molecular biology. CRISPR-Cas systems represent the main tool of this new trend, its implementation in the fields of therapeutics promises advances of a curative nature, either by acting on the editing of alterations or deficiencies of genomic origin, or by programming immunological responses appropriate for a given pathology.

KEY WORDS



CRISPR-Cas systems; molecular biology; gene editing; clinical utility; cas nuclease

INTRODUCCIÓN

Historia

Los comienzos de la tecnología CRISPR-Cas se pueden rastrear hasta el año de 1987, cuando un grupo de científicos japoneses describe el hallazgo de secuencias de ADN repetidas sin aparente función en la información genética de bacterias, posteriormente en el año de 1993, un grupo de investigadores en España describe el mismo hallazgo en arqueas, quienes en esta ocasión lo describen como “secuencias repetitivas palindrómicas separadas mediante secuencias espaciadoras”, o mejor conocidas como CRISPRs, por sus siglas en inglés (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)(1)(2).

Principio de los sistemas CRISPR-Cas

Los sistemas CRISPR-Cas corresponden a sistemas inmunes adaptativos de bacterias y arqueas(3)(4), cuyas nucleasas CRISPR y ARN guía han formado la base de poderosas herramientas en biotecnología y medicina(5)(6). Constituyen un método de modificación del genoma en el que ARNs guía dirigen la nucleasa Cas9 hacia secuencias de ADN de interés, siendo capaz de cortar ambas cadenas de ADN en dicha ubicación de manera precisa, posteriormente el mismo se repara mediante reparación no homóloga o por reparación homóloga directa, dando como resultado mutaciones que pueden interrumpir el marco de lectura y provocar inactivación genética(7)(8).

Protocolo básico de CRISPR-Cas

De acuerdo con Castillo(1), el protocolo básico de los sistemas CRISPR-Cas puede resumirse en 3 pasos, primero plantear el diseño del ARN guía capaz de unirse a Cas9 y que tenga la habilidad de reconocer y unirse a una secuencia específica del ADN o gen a modificar, conseguido esto, el siguiente paso es la introducción del complejo CRISPR-Cas9 en la célula a tratar, donde la nucleasa Cas9 realizará los cortes sobre la secuencias previamente programada a reconocer y el último paso tendrá inicio mediante la reparación del ADN de la célula debido al estímulo genera-

do por la acción de la nucleasa, llevando a pérdida o ganancia de función en la región genómica que se desea intervenir.

Potencial clínico-terapéutico de CRISPR-Cas

a) Cáncer:

Se han descrito más de 140 genes driver para cáncer hasta la fecha, razón por la cual la identificación de mutaciones de un tumor en un paciente por secuenciación del genoma ha emergido como método de diagnóstico preciso, la identificación de las mutaciones específicas plantea el uso de los sistemas CRISPR-Cas con la finalidad de reparar la misma hacia la secuencia *wild type* original, utilizando secuencias homólogas con la información genética adecuada sin las mutaciones y reemplazando las secuencias de interés mediante reparación homóloga(9). Se promueve además la utilización de los sistemas CRISPR-Cas como potenciadores de la respuesta inmune ante determinados tipos de cáncer, probando por vez primera la inyección de células T genéticamente modificadas, en las cuales se ha truncado el gen para la proteína PD-1, proteína que actúa como freno de la respuesta citotóxica y de lo cual se aprovechan las células cancerosas, esto con la hipótesis de que sin este gen las células inmunes modificadas serán capaces de atacar y destruir el cáncer(10)(11).

b) Patología cardiovascular:

Se debe considerar los objetivos moleculares específicos envueltos en una patología cardiovascular para así plantear terapias de edición genómica sobre la vía molecular determinante en la génesis de la misma, tomando por ejemplo la enfermedad coronaria, es de interés el control de los niveles elevados de colesterol LDL en sangre, en donde recientemente ha tomado importancia farmacológica la inhibición de la proproteína convertasa subtilisina/kexina tipo 9 (PCSK9) debido a su rol en la elevación de los niveles séricos de LDL(12), por medio de sistemas CRISPR-Cas de edición genómica se ha provocado la



pérdida de la función del gen que codifica para la proteína PCSK9 en ratones, consiguiendo reducciones en los niveles de colesterol LDL hasta de un 40%, lo cual ofrece un potencial prometedor terapéutico para la prevención de enfermedad cardiovascular en humanos(13).

c) **Enfermedades neurodegenerativas:**

Una barrera importante para el desarrollo de terapias efectivas para enfermedades neurodegenerativas es la comprensión incompleta de los mecanismos moleculares subyacentes(14). Los modelos animales resultan sumamente importantes para la comprensión de la patogénesis de los trastornos neurodegenerativos y encontrar tratamientos adecuados para estos, ya que los animales grandes son más similares a los humanos que los roedores, constituyen buenos modelos para identificar aquellos eventos patológicos que pueden verse en humanos, además de su utilidad para validar tratamientos efectivos o confirmar objetivos terapéuticos(7). La utilidad de los sistemas CRISPR-Cas es ampliamente reconocida en el diseño de ADN genómicos en embriones animales, así como en regiones específicas o tipos celulares del cerebro para establecer modelos animales de enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson y la enfermedad de Huntington, y tratar estos trastornos de origen genético mediante el uso de drogas y químicas y extrapolar estos resultados al ser humano, o inclusive ir más allá de la mera generación de modelos, sino de la aplicación directa de la edición de genes sobre patologías neurodegenerativas en las cuales se conoce la mutación del alelo que ocasiona la enfermedad, lo cual ha sido probado en ratones en los cuales se fue capaz de cortar un exón defectuoso del gen de la distrofina para generar una versión abreviada, pero funcional, para tratar a los ratones con distrofia muscular(15).

d) **Antimicrobianos programables:**

La aparición de bacterias resistentes a antimicrobianos representa un grave problema de salud en todo el mundo, por lo que nos encontramos en la necesidad de

poder desarrollar tratamientos eficaces y capaces de adaptarse y cambiar de manera rápida para evitar el fenómeno de resistencia; es entonces donde los antimicrobianos basados en sistemas CRISPR-Cas cobran relevancia por su capacidad adaptable para constituir un arsenal de antimicrobianos potencialmente capaces de dirigirse a cualquier bacteria patógena.(16). Los sistemas CRISPR-Cas son sistemas inmunes procariontes cuyo mecanismo puede ser utilizado para generar una nueva línea de antimicrobianos CRISPR, haciendo uso de bacteriófagos como vehículos de entrega de moléculas antimicrobianas de manera específico, incluso para aquellas afecciones de carácter intracelular, mejorando así aspectos como la entrega y la especificidad del antimicrobiano(6).

CONCLUSIONES

La implementación de nuevas tecnologías de biología molecular y de edición genómica en los laboratorios de investigación clínica ha traído consigo el desarrollo de estrategias clínico terapéuticas en el área de la salud con el objetivo principal de ofrecer opciones de tratamiento curativo para aquellas enfermedades cuyo origen genético ha sido establecido e identificado y que hasta ahora no han podido ser curadas, esto desde un punto de vista genómico, brindando tratamientos especializados y personalizados en una base genómica.

Resalta entre las más recientes tecnologías de biología molecular el uso de los sistemas CRISPR-Cas, cuyo mecanismo de acción a nivel de edición genómico ha probado ser eficiente y específico en la identificación de secuencias de ADN y su modificación como objetivo en la reparación de mutaciones de genes en ciertas enfermedades o la inserción de marcos de lectura deseados sobre determinadas poblaciones celulares, alterando ya sea la función de la síntesis proteica o la generación de proteínas truncadas no funcionales.

Entre las aplicaciones clínico terapéuticas en que se ha planteado la utilidad de los sistemas CRISPR-Cas destacan las nuevas terapias para aquellos tipos de cáncer en los cuales se ha identifica-



do mutaciones determinantes en la génesis tumoral, esto mediante la edición de estas mutaciones y la estimulación de la reparación del ADN dañado, o incluso por medio de la potenciación de respuestas citotóxicas preprogramadas para una determina traducción proteica deseada.

PERSPECTIVAS A FUTURO

Resulta una opción muy llamativa para todos los laboratorio de biología molecular alrededor del mundo la implementación de los sistemas de edición del genoma CRISPR-Cas, esto debido a la facilidad y bajo costo implicado en el desarrollo de esta herramienta, de la que de manera muy simple se puede decir que cualquier laboratorio que desee aplicarla puede hacerlo(17).

Sin embargo dicha herramienta aún debe ser sometida a numerosos escrutinios de tipo ético que garanticen el uso responsable de estas técnicas de edición del genoma en humanos, evaluando su eficacia y seguridad, incluso considerando la posibilidad de modificaciones genéticas a nivel de líneas germinales humanas bajo la creación de guías y legislación internacional(18).

Incluso a pesar de la muy estudiada especificidad de los sistemas CRISPR-Cas9, estos todavía tienen deficiencias, se ha determinado que estos pueden alterar secuencias de ADN en ubicaciones distintas al objetivo programado, lo cual podría llegar a causar silenciamiento de genes incluso esenciales, la activación de genes causantes de cáncer u ocasionar reordenamientos de orden cromosómico, generación de respuestas inmunes no deseadas, entre otras, sin embargo, lo mismo se puede decir sobre distintas drogas de uso terapéutico, las causan efectos fuera del objetivo deseado y aún así siguen siendo efectivas(19).

Otro de los aspectos a tomar en cuenta a futuro con esta herramienta será la adquisición de las licencias de uso de los diferentes laboratorios que se encuentran en conflictos legales por patentes de las mismas, lo cual puede tornar esta tarea en un impedimento legal para adquirirla con un cierto proveedor y de esta manera limitar su acceso(20).

Los sistemas CRISPR-Cas9, a pesar de haber presentado grandes avances en años recientes, todavía se encuentran en desarrollo constante para

lograr alcanzar niveles de seguridad óptimos que permitan su aplicación clínica definitiva en modelos humanos.

DECLARACIÓN DE CONFLICTO DE INTERESES

El autor declara que no existen conflictos de interés con la presente revisión bibliográfica.

BIBLIOGRAFÍA

1. Castillo A, Castillo A. Gene editing using CRISPR-Cas9 for the treatment of lung cancer. *Colomb Médica*. diciembre de 2016;47(4):178–80.
2. Marraffini LA, Sontheimer EJ. CRISPR interference: RNA-directed adaptive immunity in bacteria and archaea. *Nat Rev Genet*. marzo de 2010;11(3):181–90.
3. Sander JD, Joung JK. CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nat Biotechnol*. abril de 2014;32(4):347–55.
4. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*. el 17 de agosto de 2012;337(6096):816–21.
5. Tian P, Wang J, Shen X, Rey JF, Yuan Q, Yan Y. Fundamental CRISPR-Cas9 tools and current applications in microbial systems. *Synth Syst Biotechnol*. el 1 de septiembre de 2017;2(3):219–25.
6. Fagen JR, Collias D, Singh AK, Beisel CL. Advancing the design and delivery of CRISPR antimicrobials. *Curr Opin Biomed Eng*. el 1 de diciembre de 2017;4(Supplement C):57–64.
7. Tu Z, Yang W, Yan S, Guo X, Li X-J. CRISPR/Cas9: a powerful genetic engineering tool for establishing large animal models



- of neurodegenerative diseases. *Mol Neurodegener.* el 4 de agosto de 2015;10:35. [encodirect.com/science/article/pii/S0167779917302858](https://doi.org/10.1007/s12038-015-0035-8)
8. Kim HS, Bernitz JM, Lee D-F, Lemischka IR. Genomic Editing Tools to Model Human Diseases with Isogenic Pluripotent Stem Cells. *Stem Cells Dev.* el 15 de noviembre de 2014;23(22):2673–86.
 9. Gebler C, Lohoff T, Paszkowski-Rogacz M, Mircetic J, Chakraborty D, Camgoz A, et al. Inactivation of Cancer Mutations Utilizing CRISPR/Cas9. *J Natl Cancer Inst.* 2017;109(1).
 10. Cyranoski D. CRISPR gene-editing tested in a person for the first time. *Nature.* 24 de 2016;539(7630):479.
 11. Cyranoski D. Chinese scientists to pioneer first human CRISPR trial. *Nat News.* el 28 de julio de 2016;535(7613):476.
 12. Arend MC, Pereira JO, Markoski MM, Arend MC, Pereira JO, Markoski MM. The CRISPR/Cas9 System and the Possibility of Genomic Edition for Cardiology. *Arq Bras Cardiol.* enero de 2017;108(1):81–3.
 13. Ding Q, Strong A, Patel KM, Ng S-L, Gosis BS, Regan SN, et al. Permanent alteration of PCSK9 with in vivo CRISPR-Cas9 genome editing. *Circ Res.* el 15 de agosto de 2014;115(5):488–92.
 14. Kampmann M. A CRISPR Approach to Neurodegenerative Diseases. *Trends Mol Med.* junio de 2017;23(6):483–5.
 15. Yang W, Tu Z, Sun Q, Li X-J. CRISPR/Cas9: Implications for Modeling and Therapy of Neurodegenerative Diseases. *Front Mol Neurosci* [Internet]. el 28 de abril de 2016 [citado el 11 de diciembre de 2017];9. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4848312/>
 16. Greene AC. CRISPR-Based Antibacterials: Transforming Bacterial Defense into Offense. *Trends Biotechnol* [Internet]. el 17 de noviembre de 2017 [citado el 9 de noviembre de 2017]; Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168165617317388>
 17. Travis J. Making the cut. *Science.* el 18 de diciembre de 2015;350(6267):1456–7.
 18. Hirsch F, Lévy Y, Chneiweiss H. CRISPR-Cas9: A European position on genome editing. *Nature.* 04 de 2017;541(7635):30.
 19. Olson S, Committee on Science T, Affairs P and G, National Academies of Sciences E. International Summit on Human Gene Editing: A Global Discussion [Internet]. National Academies Press (US); 2016 [citado el 11 de noviembre de 2017]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK343651/>
 20. Storz U. CRISPR cas9 – licensing the unlicensable. *J Biotechnol* [Internet]. el 14 de noviembre de 2017 [citado el 23 de noviembre de 2017]; Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168165617317388>