

El corte que Cas9 realiza en el ADN activa un gen, p53, que revierte la corrección o provoca la muerte celular, comprometiendo la eficacia del sistema en ambos casos.[

Aunque la primera descripción de la existencia de las secuencias CRISPR en el genoma de las bacterias se hizo en 1987 por un grupo japonés[3], sin embargo se debe principalmente a los trabajos del investigador español Francisco Juan Martínez Mojica[4] en los años 1993, 2000 y 2005 el estudio de unas secuencias de ADN repetidas (las secuencias CRISPR) descubiertas en bacterias y en arqueas –que posteriormente se descubrió su relación con el sistema inmunitario de la bacteria para defenderse de los ataques de los virus que las atacan– se han convertido en una de las herramientas biotecnológicas más eficaces para modificar el genoma (edición genómica) de cualquier clase de organismo. Sin embargo, fueron Emmanuelle Charpentier y Jennifer A. Doudna quienes se dieron cuenta que este sistema ancestral de defensa de las bacterias contra la infección por virus podía convertirse en una herramienta para la modificación dirigida del material genético de otros seres vivos[5].

La característica más relevante que diferencia a los métodos de corrección del ADN por transgénesis es que el transgén se integre al azar en el genoma o que se produzca el reemplazamiento del gen original. Por otro lado, una vez producida la doble rotura en la molécula de ADN puede haber dos rutas para fijar la rotura de la doble hélice:

NHEJ (unión de extremos no homólogos) que produce la disrupción génica (INDEL, inserciones y/o deleciones).

HDR (reparación dirigida por homología) que da lugar a la reparación génica y a la edición.

El sistema CRISPR-Cas9 consta de dos elementos: una pequeña molécula de ARN (la parte CRISPR) que contiene una secuencia complementaria con la secuencia diana contra la que se dirige en el ADN, y una endonucleasa (denominada Cas9) que es una proteína con actividad enzimática capaz de cortar el ADN y hacerlo solamente donde le indique la pequeña molécula de ARN antes mencionada. Al producir la doble rotura en la molécula de ADN entran en acción otras enzimas existentes en las células que reparan el daño producido, pero que pueden generar errores al insertar o eliminar algunos nucleótidos en el lugar del corte; es decir, se genera una mutación en el gen afectado por el corte (NHEJ). Sin embargo, si se añade un tercer elemento al sistema CRISPR-Cas9 consistente en una molécula de ADN que tenga secuencias complementarias a la zona donde se producirá el corte y, además, se incorporan en esta secuencia algunos cambios específicos que no estuvieran en el genoma original, el sistema tenderá a utilizar esta molécula de ADN como molde para restaurar el corte cambiando así el genoma; es decir, editándolo (edición genómica)[6].

Phoca PDF

Como si de un procesador de textos se tratara, el sistema CRISPR-Cas9 y la molécula de ADN consiguen localizar un error y corregirlo en un gen o, viceversa, instaurar un error donde antes no lo había, reproduciendo así en un modelo animal experimental aquella mutación detectada en un paciente afectado por una enfermedad. En otras palabras, es posible reproducir en el genoma de los animales de experimentación las mismas mutaciones observadas en los pacientes.

En una revisión actualizada del tema, Lander [7]analizaba la contribución de diversos investigadores al desarrollo de los fundamentos y aplicaciones de la técnica CRISPR-Cas9. Los 12 “héroes CRISPR” –como él los llama– son, por orden de aparición en escena:

Descubrimiento de CRISPR: Francisco Juan Martínez Mojica (1993)

CRISPR es un sistema inmune adapatativo: F.J.M. Mojica (2005), Gilles Vergnaud (2005), Alexander Bolotin (2005)

Evidencia experimental de que CRISPR confiere inmunidad adaptativa y utiliza una nucleasa: Philippe Horvath (2007)

Programando CRISPR: John van der Oost (2008)

Dianas CRISPR en el ADN: Luciano Marrafini (2008)

Cas9 es guiada por crRNAs y crea dobles roturas en el ADN: Sylvain Moineau (2008)

Reconstituyendo CRISPR en un organismo distante: Virginijus Siksnys (2011)

Estudiando CRISPR in vitro: V. Siksnys (2012), Emanuelle Charpentier (2012), Jennifer A. Doudna (2012)

Edición genómica en células de mamíferos: Feng Zhang (2012, 2013), George Church (2013)

Para la historia de la ciencia genética -dice Lander- es interesante señalar que:

El reciente hallazgo de que se poseen anticuerpos contra Cas9, es lo que podría dificultar la aplicación clínica de la técnica, al minar su eficacia, o incluso suponer un riesgo para los pacientes, debido a la respuesta inmune.

Los grandes descubrimientos genéticos aplicables a la biomedicina pueden surgir de datos científicos totalmente impredecibles. Por ejemplo, CRISPR ha sido consecuencia de una mezcla de:

Curiosidad personal (tratar de entender la repetición de secuencias en el ADN de bacterias tolerantes a la sal).

Exigencia militar (defensa contra armas biológicas).

La aplicación industrial (mejorar la producción de yogurt).

El papel cada vez más importante en la investigación biológica de los descubrimientos “libres de hipótesis” basados en los grandes bancos de datos (big data) de la bioinformática.

Varios de los científicos principales actores de la historia de CRISPR hicieron sus trabajos seminales al principio de sus carreras científicas (por ejemplo, Mojica, Horvath, Marrafini, Charpentier, Zhang), algunos de ellos con edades inferiores a los 30 años.

Algunos de los pioneros de CRISPR no trabajaban en centros de investigación dentro de los “circuitos” científicos de renombre internacional (por ejemplo, la Universidad de Alicante, el Ministerio de Defensa de Francia, los laboratorios de la empresa Danisco en Dinamarca, la Universidad de Vilnius en Lituania) y sus trabajos originales fueron rechazados para su publicación en revistas del mayor prestigio (Nature, Proceedings of the National Academy of Sciences, Molecular Microbiology, Nucleic Acid Research, Journal of Bacteriology, etc.).

Los grandes descubrimientos científicos no se corresponden normalmente con un “eureka” instantáneo, sino que

Phoca PDF

se van elaborando durante muchos años.

En la actualidad

El sistema de edición genética CRISPR-Cas9 causa más daño en el ADN celular de lo que hasta ahora se creía, y éste no es detectado por las pruebas estándar, según revela un estudio publicado en Nature Biotechnology[8].

Todavía quedan aspectos técnicos por pulir, como la dificultad de introducir transgenes en las células que no se dividen, que componen la mayoría de los órganos adultos, como el corazón, el cerebro, el páncreas o los ojos.[9]

Si bien ya se sabía que CRISPR-Cas9 puede producir efectos off-target, es decir, fuera de la secuencia deseada del genoma, este estudio revela que también aunque el sistema actúe on-target, es decir, en el sitio esperado, se producen mutaciones no deseadas cuya entidad es considerable, teniendo lugar grandes deleciones (eliminación de ADN) y complejos reordenamientos, lo que puede comprometer gravemente la función genética. Además, muchas de las mutaciones producidas no pueden ser detectadas mediante los métodos de genotipado estándar.

“Esta es la primera evaluación sistemática de eventos inesperados que resultan de la edición CRISPR/Cas9 en células relevantes terapéuticamente, y es posible encontrar que los cambios en el ADN se han subestimado gravemente”- dice el autor correspondiente del trabajo, el profesor Allan Bradley.- Es importante que cualquiera que piense en usar esta tecnología para la terapia génica proceda con precaución y observe cuidadosamente los posibles efectos nocivos”.

Los autores del trabajo concluyen que “en el contexto clínico de editar muchos miles de millones de células, la multitud de diferentes mutaciones generadas hace que sea probable que una o más células editadas en cada protocolo estén dotadas de una importante lesión patogénica. Tales lesiones pueden constituir un primer “golpe” cancerígeno en células madre y progenitoras […] Los resultados informados aquí también ilustran la necesidad de examinar exhaustivamente el genoma cuando la edición se realiza ex vivo. Dado que el daño genético es frecuente, extenso e indetectable por los ensayos de PCR de corto alcance que se utilizan comúnmente, se justifica un análisis genómico completo para identificar las células con genomas normales antes de la administración al paciente”.

Efectivamente, este descubrimiento supone una nueva traba en la aplicación de CRISPR en terapia génica, es decir, su uso en la cínica para curar enfermedades mediante la corrección genética. Anteriormente se publicaba que Cas9 podía inducir una respuesta inmune en humanos[10] y que CRISPR es más eficaz en células proclives a desarrollar tumores, lo que podría favorecer la selección de estas células a la hora de implantarlas en el paciente. Por todo ello, parece que la técnica no está lista para su aplicación en humanos, aunque lo cierto es que los ensayos clínicos ya han comenzado.

En opinión del Observatorio, investigaciones adicionales en modelos animales y de células humanas deberán esclarecer si hay más riesgos que aún se desconocen y cómo puede afinarse esta herramienta para que su uso sea eficaz y seguro. Ante estos riesgos, los ensayos clínicos deben replantearse, y definir con suma precaución los criterios de elegibilidad. Así mismo, alternativas como la edición de base, la edición de ARN o la modulación de la actividad genética mediante CRISPR deben potenciarse, pues podrían resultar más seguras.

Premio Nobel de química

El premio Nobel de química de 2020 se ha concedido a Emmanuelle Charpentier y Jennifer A. Doudna por la creación de un nuevo y muy preciso método para la modificación del ADN de plantas, animales o personas, unas «tijeras genéticas» conocidas como CRISPR-Cas 9.[11]

Emmanuelle Charpentier y Jennifer A. Doudna han recibido el premio Nobel de química de 2020 por haber desarrollado un método de edición del genoma.

Se trata de un mecanismo que actúa de forma natural en organismos procariotas (arqueas y bacterias), donde viene a ser una especie de sistema inmunitario. Charpentier y Doudna idearon la forma de aplicarlo artificialmente, y con otras finalidades, también en organismos con células eucariotas, entre ellos los seres humanos. Así abrieron la ruta hacia posibles nuevas terapias contra el cáncer y la cura de enfermedades hereditarias.

Phoca PDF

Emmanuelle Charpentier, nacida en Francia en 1968, actualmente directora de la Unidad Max Planck de Ciencia de los Patógenos, en Berlín, descubrió en sus investigaciones con la bacteria Streptococcus pyogenes un nuevo componente de ese sistema inmunitario CRISPR-Cas de la bacteria, la molécula ARNtracr, tal y como publicó con sus colaboradores en 2011 (para ese momento trabajaba en laboratorios de las Universidades de Umeå y Viena).

Ese mismo año empezó su colaboración con Jennifer Doudna, experta en ARN que nació en 1964 en Estados Unidos, profesora de la Universidad de California, Berkeley, e investigadora del Instituto Médico Howard Hughes de la misma universidad. El fruto de sus esfuerzos compartidos fue la reproducción de esas tijeras genómicas bacterianas en el tubo de ensayo y su simplificación para un uso más viable.

En el proceso de corte que confiere inmunidad al procariota desempeña una función importante Cas9, de la familia Cas. Es una enzima que actúa sobre el ADN guiada por ARN. Esa guía está compuesta por dos ARN asociados, uno de ellos el descubierto por Charpentier. Las investigadoras crearon una quimera con las dos formas de ARN. Esta simplificación sería un paso esencial para la conversión del mecanismo natural en una herramienta de ingeniería genética. Fue entonces cuando resultó posible reprogramar las tijeras genéticas para que, en vez de que reconocieran el ADN de virus específicos, como ocurre en la naturaleza, se pudiese controlarlas de manera que cortasen cualquier molécula de ADN en sitios predeterminados.

A partir de entonces se produjo una explosión de las investigaciones del nuevo método. Con él se han desarrollado plantas cultivadas más resistentes. Pero la gran esperanza es que permita múltiples nuevas terapias para los seres humanos. Ya se han emprendido ensayos de tratamientos de la anemia de células falciformes, el cáncer o la ceguera hereditaria que se basan en CRISPR.

Basado en L. Montoliu, en bioeticawiki.com/

Notas:

1. Basado en Montoliu, L. (2015). Las herramientas CRISPR: Un regalo inesperado de las bacterias que ha revolucionado la biotecnología animal. Recuperado de http://www.comunicabiotec.org

Observatorio de Bioética UCV (20 de junio de 2018). «La revolucionaria herramienta de edición genética CRISPR-Cas9 podría provocar cáncer».

2. Observatorio bioética. Consultado el 15 de octubre de 2020.

3. Ishino, Y., Shinagawa, H., Makino, K., Amemura, M., Nakata, A. (1987). Nucleotide sequence of the iap gen , responsable for alkaline phosphatase isozyme conversión in Escherichia coli, and identification of the gen product. J. Bacteriol. 169:5429-5433

4. Mojica, F.J.M., Juez, G., Rodríguez-Valera, F. (1993). Transcription at different salinities of Haloferax mediterranei sequences adjacent to partially modified Patl sites. Mol. Micribiol. 9:613-621

5. Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J.A., Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity, Science 337:816-821

6. Montoliu, L. (2015). Las herramientas CRISPR: Un regalo inesperado de las bacterias que ha revolucionado la biotecnología animal. Recuperado de http://www.comunicabiotec.org

7. Lander, E.S. (2016). The Heroes of CRISPR. Cell 164:18-28.

8. «crispr-Cas9».

9. Observatorio de Bioética UCV (17 de noviembre de 2016). «Se utiliza CRISPR por primera vez en humanos». Observatorio de Bioética. Consultado el 15 de octubre de 2020.

10. Martín, Bruno (15 de enero de 2018). «La edición genética se topa con las defensas inmunitarias de sus pacientes». El País. Consultado el 15 de octubre de 2020.

11. Campos, Juan Pedro (7 de octubre de 2020). «Premio Nobel de química para el método CRISPR-Cas9 de edición del genoma». Investigación y

Phoca PDF

Ciencia. Consultado el 1 de noviembre de 2020.

Phoca PDF