

¿Mejoramiento Genético o Manipulación Genética? Aplicaciones de la técnica CRISPR-Cas

Genetic Improvement or Genetic Manipulation?
Applications of the CRISPR-Cas technique

Resumen

La técnica CRISPR-Cas es una técnica de biología molecular descrita en el año 2012 por Jennifer Doudna y Emmanuelle Charpentier, la cual consiste en editar en lugares específicos el genoma de bacterias, plantas, animales e incluso del humano. Tiene la finalidad de corregir o mejorar alguna característica de interés. Sus aplicaciones abarcan áreas como la agricultura, medicina, biomedicina, biotecnología, microbiología, entre otras. El presente trabajo tiene el objetivo de describir la técnica de CRISPR-Cas y algunos de sus alcances de hoy en día, así como algunas de sus limitaciones.

Palabras clave: Genes, Edición genética, CRISPR-Cas

Recursos Naturales y Sociedad, 2022. Vol. 8 (2): 01-10. <https://doi.org/10.18846/renaysoc.2022.08.08.02.0001>

Elsy Janeth Ramos González¹, Óscar Kurt Bitzer Quintero², Luis Javier Ramírez Jirano²

²Unidad de Investigación Biomédica de Zacatecas, IMSS. Zacatecas, Zacatecas, México

¹Centro de Investigación Biomédica de Occidente, IMSS. Guadalajara, Jalisco, México
ramirez_jirano@hotmail.com

Abstract

CRISPR-Cas is a molecular biology technique described in 2012 by Jennifer Doudna and Emmanuelle Charpentier, which consist in editing the genome of bacteria, plants, or animals, including human, in specific places. It has the objective of correcting or improving some characteristics of interest. His applications comprise agriculture, medicine, biomedicine, biotechnology, microbiology, and others. This work aims to describe the CRISPR-Cas technique and its scope today, as well as some of its limitations.

Keywords: Gen, Genetic edition, CRISPR-Cas



Introducción

En octubre del año 2020, las científicas Jennifer Doudna, de origen estadounidense, y Emmanuelle Charpentier, de origen francés, obtuvieron el premio Nobel de Química 2020 por el desarrollo de un método de edición genética, llamado CRISPR-Cas9 (The Nobel Prize, 2022). La técnica de CRISPR-Cas es una herramienta de edición del genoma que se ha utilizado para modificar genes de manera rápida, fácil y eficiente en una amplia variedad de tipos de células biomédicamente importantes y en organismos que tradicionalmente han sido difíciles de manipular genéticamente. El poder de esta técnica para realizar alteraciones específicas y altamente eficientes de la secuencia del genoma y la expresión génica sin duda está transformando la investigación en varias áreas de estudio (Sander JD et al., 2014; Giau Vo Van et al., 2018). El presente trabajo tiene el objetivo de describir la técnica de CRISPR-Cas y algunos de sus alcances de hoy en día, así como ciertas limitaciones.

Historia de la técnica CRISPR-Cas

La técnica CRISPR-Cas surge del estudio del sistema inmune de las bacterias, ya que tienen en su código genético secuencias repetidas que están muy bien conservadas, es decir, que se han mantenido sin grandes cambios entre especies de bacterias y a lo largo de los años. Estas zonas de repetición son llamadas repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente espaciadas que, por su nombre en inglés, *clustered regularly interspaced short palindromic repeats*, toma la abreviatura de CRISPR. Las secuencias repetidas fueron descritas por primera vez hace más de 30 años, en 1987, durante una investigación del genoma

de la fosfatasa alcalina de la bacteria *Escherichia coli*. En ese momento, era bastante difícil definir la función biológica de estas secuencias inusuales, no fue sino hasta los mediados de la década de los 2000 que fue descrita su función. En 1993, las CRISPR fueron descritas por primera vez en otras especies de microorganismos conforme la ciencia adoptaba mas el estudio de los genomas; por ejemplo, en las archeas (*Haloferax mediterranei*) y algunas otras bacterias. A principios de la década de los 2000, finalmente se condujo al descubrimiento de la función de CRISPR como un sistema inmune bacteriano. Este descubrimiento en un inicio fue menospreciado por la comunidad científica, pero finalmente algunos años después se aceptó como tal. De manera paralela, se propusieron varios genes para codificar proteínas de reparación

del ácido desoxirribonucleico (ADN), los cuales se asociaron estrechamente con CRISPR y se designaron como genes *Cas* (del inglés, *CRISPR-associated*) (Ishino Y et al., 2018).

Gracias a los estudios genómicos comparativos fue que se sugirió que las proteínas CRISPR y las proteínas Cas en realidad trabajan juntas y constituyen un sistema de inmunidad adquirida para proteger a las bacterias de manera análoga a otros sistemas inmunes de células animales, plantas y hongos (figura 1) (Ishino Y et al., 2018).

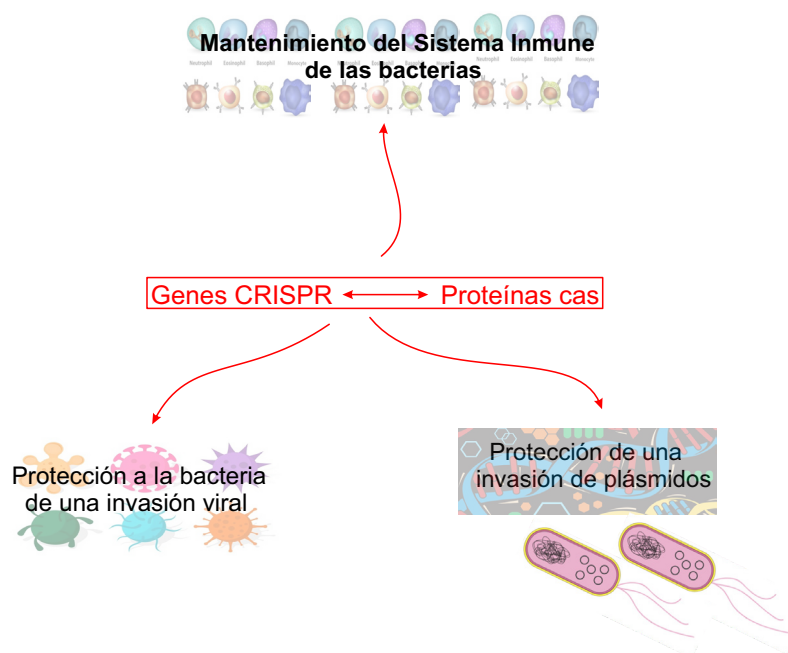


Figura 1. Función bacteriana de la técnica CRISPR-Cas. Los estudios genómicos comparativos demostraron que las CRISPR y las proteínas Cas trabajan en conjunto, constituyendo el sistema inmune de bacterias protegiéndolas de la invasión de virus y plásmidos. Las CRISPR-Cas protegen a las bacterias de manera análoga a otros sistemas inmunes de células animales, plantas y hongos.

Descripción de la técnica de CRISPR-Cas

La técnica CRISPR-Cas es una técnica de biología molecular que consiste en “cortar y pegar”, de manera precisa, partes de la información genética contenida en el ADN en lugares específicos del genoma (Sander JD et al., 2014).

El ADN consta de dos cadenas que se enrollan entre ellas para formar una estructura de doble hélice.

Cada cadena tiene una parte central formada por azúcares (desoxirribosa) y grupos químicos fosfato.

Enlazados a cada azúcar hay una de las siguientes bases nitrogenadas: adenina (A), citosina (C), guanina (G) y timina (T). Las dos cadenas se mantienen unidas por enlaces entre las bases.

La secuencia de estas bases es lo que codifica las instrucciones para formar proteínas y moléculas de ácido ribonucleico (ARN's), que son ácidos nucleicos de una sola cadena que aportan la información para la producción de proteínas (Christopher P. Austin et al., 2022). Con el uso de la técnica CRISPR-Cas da la posibilidad de editar el código genético, es decir, es posible modificar la cadena de bases nitrogenadas del ADN de microorganismos y



de organismos superiores, como las plantas y animales, de manera que se pueda corregir un error genético, mejorar o introducir una nueva característica deseable (Sander JD et al., 2014).

Como ya se mencionó, las bacterias tienen en su código genético secuencias repetidas que se asocian a un conjunto de genes que codifican proteínas reparadoras de ADN llamadas Cas. Las proteínas Cas tienen dominios de nucleasas, es decir, zonas que rompen los enlaces entre los nucleótidos de los ácidos nucleicos, lo que ayuda a romper el genoma invasor. El ADN invasor es cortado por una nucleasa Cas en pequeños fragmentos de ADN que después son incorporados a una región específica del genoma bacteriano como un nuevo espaciador, es decir, como una región del código genético que no copia a ARN y que se localizan entre genes que sí lo hacen. Después, la región CRISPR se transfiere a un ARN – CRISPR incluyendo un espaciador y una secuencia parcial repetida. Finalmente, el ARN – CRISPR guía a la proteína Cas hacia los ácidos nucleicos extraños, lo que desencadena la degradación de las secuencias de ADN invasor. De esta manera, tanto los genes CRISPR como las proteínas Cas trabajan en conjunto para proteger a las bacterias de la invasión de virus, de moléculas pequeñas circulares de ADN, llamados plásmidos, o de moléculas de ARN; constituyendo así el sistema inmune bacteriano (Hryhorowicz M et al., 2017; Ishino, Y et al., 2018), el cual es altamente adaptativo y heredable ya que incorpora pequeñas secuencias de virus y otros elementos génicos en la secuencia de CRISPR de las mismas bacterias para ser transcritos y procesados en RNAs que guían la destrucción de ácidos nucleicos invasores (Charpentier E, 2014).

Las secuencias guía, dentro de los espaciadores CRISPR, normalmente corresponden a genomas extraños que constituyen la forma de la inmunidad adquirida de las bacterias.

Sin embargo, puede sustituirse fácilmente por una secuencia de interés para ser dirigidos a la proteína Cas. Los cortes específicos de la doble cadena de ADN, generadas por las proteínas Cas, inducen procesos de reparación de ADN celular que pueden explotarse para modificar el genoma (Hryhorowicz M et al., 2017).

Por tanto, la edición genética es una técnica de laboratorio que introduce mutaciones o cambios intencionales en el ADN en forma de inserciones (adición de uno o más pares de bases de nucleótidos en una secuencia de ADN), deleciones (pérdida de un solo par de nucleótidos de ADN o de un fragmento de cromosoma) o sustituciones

de bases nitrogenadas (intercambio de un par de bases por un par de bases diferente) en las secuencias blanco para corregir un error o mejorar una característica deseable (Raul Torres-Ruiz et al., 2017).

Aplicaciones de la técnica de CRISPR-Cas

El descubrimiento del sistema CRISPR-Cas permitió a los científicos pensar en realizar ediciones del genoma de microorganismos que antes era complicado manipular sus genes, de plantas, animales e incluso del humano. Por lo que esta tecnología es fácil de diseñar y producir, siendo altamente eficiente y económica. De esta manera su implementación ha crecido entre los científicos ya que es sencilla, versátil y específica, estableciendo una de las herramientas más poderosas de la ingeniería genética.

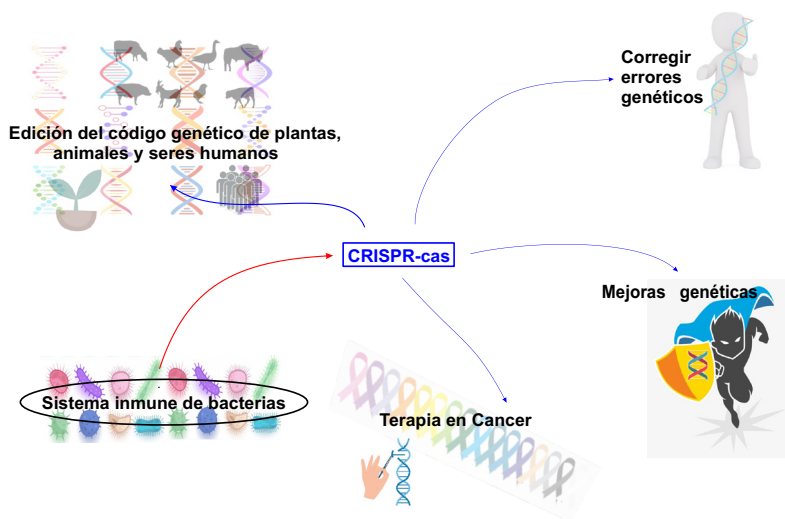


Figura 2. Aplicaciones de la técnica CRISPR-Cas en el campo de la medicina, biomedicina y biotecnología. Sus aplicaciones son bastante diversas, algunas están relacionadas a las áreas de medicina, biomedicina, biotecnología. Donde se ha estudiado e implementado tratamientos dirigidos y específicos de enfermedades genéticas o contra el cáncer. Además, se ha buscado corregir errores genéticos, pudiendo evitar el desarrollo de enfermedades hereditarias.

Sus aplicaciones podrían ser prácticamente infinitas (figura 2), algunas están relacionadas a las áreas de

agricultura, medicina, biomedicina, biotecnología, microbiología, entre otras (tabla 1). Si hablamos del campo de la agricultura, se ha estudiado la posibilidad de mejorar una característica deseable en una especie para que sea más nutritiva o sea más fuerte a las inclemencias de la naturaleza. En el campo de la medicina, se ha buscado implementar tratamientos dirigidos y específicos. Por ejemplo, en el tratamiento del cáncer se podría desarrollar una nueva terapia dirigida a las células que han sido dañadas. También en las enfermedades genéticas, las cuales se desarrollan debido a que un gen no está transmitiendo la información de manera correcta, ello lleva a la aparición de una enfermedad o trastorno que no se puede curar, tales como fibrosis quística, anemia falciforme, distrofia muscular de Duchenne o hemofilia, entre muchas



otras. Por lo que con esta técnica se podría vislumbrar una posible cura o al menos un tratamiento que impacte positivamente en la calidad de vida de los pacientes que la sufren. En el campo de la biomedicina, se podría utilizar para realizar cambios en los mecanismos que regulan la expresión de genes, para buscar de manera intencionada genes alterados para prevenir la aparición de enfermedades o características no deseadas; para avanzar significativamente en el tema de trasplantes de órganos o células entre especies cercanas; en la medicina regenerativa podría ayudar a reemplazar, reestablecer o regenerar células, tejidos u órganos para restaurar su funcionamiento normal; o bien, creando modelos animales que ayuden en el estudio de enfermedades no muy comunes o raras que afectan al humano (Raul Torres-Ruiz et al., 2017).

Tabla 1. Aplicaciones de la técnica CRISPR-Cas por área de conocimiento.

Área	Aplicaciones	Referencias
Agricultura	<ul style="list-style-type: none"> • Mejoramiento de características deseables. • Promover que una especie sea más fuerte a las inclemencias de la naturaleza. 	<ul style="list-style-type: none"> • Jiang W, et al. 2013 • Schenke D, et al. 2020
Medicina	<ul style="list-style-type: none"> • Búsqueda de tratamientos dirigidos y específicos en diferentes enfermedades. • Ayudar a reemplazar, reestablecer o regenerar células, tejidos u órganos para restaurar su funcionamiento normal. 	<ul style="list-style-type: none"> • Long C, et al. 2014 • Chen M, et al. 2019
Biomedicina	<ul style="list-style-type: none"> • Cambios en los mecanismos que regulan la expresión de genes. • En el trasplantes de órganos o células entre especies cercanas. • Desarrollo de modelos de estudio de enfermedades tales como cáncer, inmunitrias, genéticas, neurológicas, cardiovasculares, infecciosas y de enfermedades raras. • Estudiar los mecanismos moleculares fisiopatológicos de diversas enfermedades. 	<ul style="list-style-type: none"> • Yang L, et al. 2015 • Seruggia D, et al. 2015 • Wang H, et al. 2013 • Schwank G, et al. 2013
Microbiología	<ul style="list-style-type: none"> • Identificación de microorganismos. 	<ul style="list-style-type: none"> • Liu Q, et al. 2021 • Hsu JF, et al. 2021
Bioteología	<ul style="list-style-type: none"> • Estudio y desarrollo de herbicidas. • Evolución de tecnologías existentes. 	<ul style="list-style-type: none"> • Kowalczyk T et al. 2022 • Zhu H et al. 2020

Desventajas del uso de la técnica de CRISPR-Cas

No todo es miel sobre hojuelas, el sistema CRISPR-Cas permite la modificación permanente del genoma y, por lo tanto, crea efectos fuera del objetivo que deben controlarse. Entre las

desventajas que tiene el uso de la técnica, se encuentran la posibilidad de crear mutaciones en lugares del genoma no deseables, mutaciones silenciosas (sustituciones de bases de nucleótidos que no producen cambios en la funcionalidad de la cadena de aminoácidos), variaciones estructurales del ADN, tales como deleciones (pérdida de nucleótidos o un fragmento de ADN), inversiones (un segmento de ADN cambia de sentido), duplicaciones (repetición de un fragmento de ADN) y rearrreglos que podría ocasionar más problemas que beneficios (Manghwar H et al., 2019).

Otra desventaja recae en que podría ser utilizada con fines no tan benéficos, cayendo en acciones poco éticas. Se debe considerar las cuestiones éticas, las preocupaciones de seguridad y las dificultades de aplicación, para predecir cuales serian los posibles límites del uso de la técnica (figura 3). Poniendo esto junto se vislumbra que la edición terapéutica del genoma en embriones humanos no será posible en un futuro próximo (Ayanoğlu FB et al., 2020).

Por otro lado, no deben olvidarse los efectos potenciales de CRISPR-Cas en otras áreas.

También se deben discutir las interacciones con otros organismos y el medio ambiente, como en la evaluación de riesgos, las medidas de seguridad para prevenir la degradación ecológica o el uso potencial en la mejora genética de animales y productos agrícolas (Ayanoğlu FB et al., 2020).

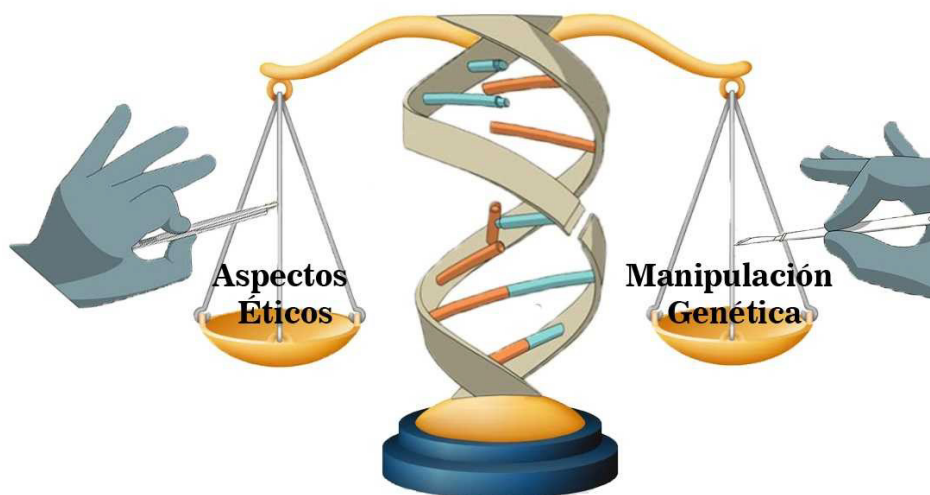


Figura 3. Consideraciones bioéticas del uso de la técnica CRISPR-Cas. Se debe considerar las cuestiones éticas, las preocupaciones de seguridad y las dificultades de aplicación, para predecir cuales serian los posibles límites del uso de la técnica CRISPR-Cas.



Consideraciones finales

La velocidad con la que avanza CRISPR refleja su utilidad, sencillez y eficiencia. Debido a que las aplicaciones de la técnica de CRISPR-Cas son tan variadas y diversas, la ha convertido en una plataforma multifuncional cuya aplicabilidad va más allá de la edición de un solo gen para realizar la edición múltiple, la regulación específica de la secuencia de la expresión génica y las pantallas de todo el genoma de otras plataformas (Raul Torres-Ruiz et al., 2017). Estos nuevos desarrollos metodológicos han incrementado considerablemente las alternativas tecnológicas para el estudio de la función génica y para el modelado en diversos organismos y enfermedades. Por tanto, utilizada de la manera adecuada bajo la normativa correcta, tendría más beneficios que perjuicios.

Agradecimientos

A Lic. Gerardo Hernández, por el diseño gráfico editorial para este artículo

Literatura citada

- The Nobel Prize. 2022. *Popular information, Genetic scissors: a tool for rewriting the code of life*. En: <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2020/popular-information/>. (Consultado el 1/ 02/ 2022).
- Sander JD, Joung JK. 2014. *CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes*. Nature Biotechnology 32(4):347-55. DOI: 10.1038/nbt.2842.
- Giau VV, Lee H, Shim KH, Bagyinszky E, An SSA. 2018. *Genome-editing applications of CRISPR-Cas9 to promote in vitro studies of Alzheimer's disease*. Clinical Interventions in Aging 13: 221-233. DOI: 10.2147/CIA.S155145.
- Ishino, Y., Krupovic, M., Forterre, P. 2018. *History of CRISPR-Cas from Encounter with a Mysterious Repeated Sequence to Genome Editing Technology*. Journal of Bacteriology 200(7): e00580 17. DOI: 10.1128/JB.00580-17.
- Christopher P. Austin. *ADN (Ácido Desoxirribonucleico)*. National Human Genome Research Institute. En: <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/ADN-acido-Desoxirribonucleico> (Consultado el 31/ 03/ 22).

- Hryhorowicz, M., Lipiński, D., Zeyland, J., Słomski, R. 2017. *CRISPR/Cas9 Immune System as a Tool for Genome Engineering*. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* (Warsz) 65(3): 233-240. DOI: 10.1007/s00005-016-0427-5.
- Charpentier E, Marraffini LA. 2014. *Harnessing CRISPR-Cas9 immunity for genetic engineering*. *Current Opinion in Microbiology* 19:114-119. DOI: 10.1016/j.mib.2014.07.001.
- Raul Torres-Ruiz, Sandra Rodriguez-Perales. 2017. *CRISPR-Cas9 technology: applications and human disease modelling*. *Briefings in Functional Genomics*. 16(1): 4-12. DOI: 10.1093/bfgp/elw025.
- Manghwar, H., Lindsey, K., Zhang, X., Jin, S. 2019. *CRISPR/Cas System: Recent Advances and Future Prospects for Genome Editing*. *Trends in Plant Science* 24(12): 1102-1125. DOI: 10.1016/j.tplants.2019.09.006.
- Ayanoğlu FB, Elçin AE, Elçin YM. 2020. *Bioethical issues in genome editing by CRISPR-Cas9 technology*. *Turk J Biol*. 44(2):110-120. DOI: 10.3906/biy-1912-52.
- Jiang W, Zhou H, Bi H, Fromm M, Yang B, Weeks DP. 2013. *Demonstration of CRISPR/Cas9/sgRNA-mediated targeted gene modification in Arabidopsis, tobacco, sorghum and rice*. *Nucleic Acids Research*. 41: e188. DOI: 10.1093/nar/gkt780.
- Schenke D, Cai D. 2020. *Applications of CRISPR/Cas to Improve Crop Disease Resistance: Beyond Inactivation of Susceptibility Factors*. *iScience* 20;23(9):101478. DOI: 10.1016/j.isci.2020.101478.
- Long C, McAnally JR, Shelton JM, Mireault AA, Bassel-Duby R, Olson EN. 2014. *Prevention of muscular dystrophy in mice by CRISPR/Cas9-mediated editing of germline DNA*. *Science* 345:1184–1188. DOI: 10.1126/science.1254445.
- Chen M, Mao A, Xu M, Weng Q, Mao J, Ji J. 2019. *CRISPR-Cas9 for cancer therapy: Opportunities and challenges*. *Cancer Lett*. 447:48-55. DOI: 10.1016/j.canlet.2019.01.017.
- Yang L, Güell M, Niu D, George H, Lesha E, Grishin D, Aach J, Shrock E, Xu W, Poci J, Cortazio R, Wilkinson RA, Fishman JA, Church G. 2015. *Genome wide inactivation of porcine endogenous retroviruses (PERVs)*. *Science* 350:1101–1104. DOI: 10.1126/science.aad1191.
- Seruggia D, Fernández A, Cantero M, Pelczar P, Montoliu L. 2015. *Functional validation of mouse tyrosinase non-coding regulatory DNA elements by CRISPR-Cas9-mediated mutagenesis*. *Nucleic Acids Res*. 43:4855–4867. DOI: 10.1093/nar/gkv375.
- Wang H, Yang H, Shivalila CS, Dawlaty MM, Cheng AW, Zhang F, Jaenisch R. 2013. *One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering*. *Cell* 153:910–918. DOI: 10.1016/j.cell.2013.04.025.

- Schwank G, Koo BK, Sasselli V, Dekkers JF, Heo I, Demircan T, Sasaki N, Boymans S, Cuppen E, van der Ent CK, Nieuwenhuis EE, Beekman JM, Clevers H. 2013. *Functional repair of CFTR by CRISPR/Cas9 in intestinal stem cell organoids of cystic fibrosis patients*. Cell Stem Cell. 13(6): 653-8. DOI: 10.1016/j.stem.2013.11.002.
- Liu Q, Wang S, Long J, Chen Z, Yang B, Lin F. 2021. *Functional Identification of the Xanthomonas oryzae pv. oryzae Type I-C CRISPR-Cas System and Its Potential in Gene Editing Application*. Front Microbiology 12:686715. DOI: 10.3389/fmicb.2021.686715.
- Hsu JF, Lu JJ, Lin C, Chu SM, Lin LC, Lai MY, Huang HR, Chiang MC, Tsai MH. 2021. *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat Analysis of Clonal Complex 17 Serotype III Group B Streptococcus Strains Causing Neonatal Invasive Diseases*. Int J Mol Sci. 22 (21): 11626. DOI: 10.3390/ijms222111626.
- Zhu H, Li C, Gao C. 2020. *Applications of CRISPR-Cas in agriculture and plant biotechnology*. Nat Rev Mol Cell Biol. 21(11):661-677. DOI: 10.1038/s41580-020-00288-9.
- Kowalczyk T, Merecz-Sadowska A, Picot L, Brčić Karačonji I, Wieczfinska J, Śliwiński T, Sitarek P. 2022. *Genetic Manipulation and Bioreactor Culture of Plants as a Tool for Industry and Its Applications*. Molecules. 27(3): 795. DOI: 10.3390/molecules27030795

Cita:

Ramos González E.J., Bitzer Quintero O.K., Ramírez Jirano L.J. 2022 ¿Mejoramiento Genético o Manipulación Genética? Aplicaciones de la técnica CRISPR-Cas. Recursos Naturales y Sociedad, 2022. Vol. 8 (2): 01-10. <https://doi.org/10.18846/renaysoc.2022.08.08.02.0001>

Sometido: 10 de agosto de 2022

Revisado: 12 de septiembre de 2022

Aceptado: 15 de octubre de 2022

Editora asociada: Dra. Tania Zenteno Savin

Diseño gráfico editorial: Lic. Gerardo Hernández

Fotos artículo de portada : gmo-plant-vial-laboratory-chemistry-biology-1654629-pxhere.com.jpg, hand-nature-liquid-pxhere