



Universidad de Jaén

Facultad de Ciencias
Experimentales

SISTEMA CRISPR/Cas Y SU APLICACIÓN A LA EDICIÓN DIRIGIDA DE GENOMAS

Autor: María Barbudo Rosales

Grado de Biología

Fecha: 02/07/2024



CREA



Universidad de Jaén



Trabajo Fin de Grado

SISTEMA CRISPR/Cas Y SU APLICACIÓN A LA EDICIÓN DIRIGIDA DE GENOMAS

Alumno/a: María Barbudo Rosales
Jaén, Julio, 2024

1. Resumen.....	3
2. Introducción	4
2.1 Descubrimiento	5
2.2 Papel biológico	5
2.3 Componentes y mecanismo de acción.....	8
2.4 Clasificación de los sistemas CRISPR/Cas.....	9
2.5 Aplicación del sistema CRISPR/Cas a la edición genómica.....	12
3. Técnica CRISPR/Cas9.....	12
3.1 Adaptación	15
3.2 Biogénesis del ARNcr	16
3.3 Interferencia	18
3.4 Reparación.....	19
3.4.1 Unión de extremos no homólogos (NHEJ).....	19
3.4.2 Reparación dirigida por homología dependiente del donante (HDR).....	20
3.5 Administración del sistema CRISPR/Cas al huésped	20
3.5.1 Entrega viral.....	23
3.5.2 Entrega no viral.....	24
3.6 Evolución lamarckiana vs. darwiniana.....	25
4. Consecuencias y aplicaciones CRISPR/Cas9	26
4.1 Consecuencias de CRISPR/Cas9	26
4.1.1 Inserciones y reemplazo de genes	26
4.1.2 Inversiones y translocaciones.....	27
4.2 Terapia génica.....	28
4.3 VIH	30
5. Inconvenientes del sistema CRISPR/Cas9: efectos Off target.....	30
6. Conclusión y perspectiva de futuro	32
7. Bibliografía	34

1. Resumen

La edición genómica modifica de manera precisa el ADN de un organismo, ya que permite la adición o supresión de secuencias concretas o genes específicos. Esta herramienta es de amplio espectro. Entre sus aplicaciones destacan las centradas en investigación clínica, que sirven para crear terapias o conocer y suprimir los genes que generan una enfermedad, y las industriales, dirigidas a la creación de fármacos, combustibles, etc. Aunque también se usa en industria alimentaria y mejora, para hacer a los organismos más resistentes ante ciertas adversidades como puede ser la sequía.

La tecnología de edición genómica CRISPR/Cas es un método revolucionario que permite alterar el ADN de un organismo de manera precisa para modificar o corregir genes específicos. Hoy en día, esta herramienta se usa principalmente para editar genes de manera eficiente y exacta en gran variedad de organismos vivos, incluidos los humanos.

El sistema CRISPR/Cas9 ha revolucionado el campo de la edición genómica, se emplea para producir la supresión o adición de genes *in vitro*, debido a la facilidad de uso, su bajo coste y el amplio rango de especies en las que puede utilizarse, esta técnica tiene una gran cantidad de aplicaciones, incluyendo su utilización en terapia génica.

En el presente trabajo se han revisado artículos relevantes y recientes sobre CRISPR/Cas, con aplicaciones potenciales en numerosos campos, incluyendo medicina, agricultura y biotecnología.

2. Introducción

La ingeniería genética surge en los años 70 con el descubrimiento de las enzimas de restricción. Gracias a ellas fue posible manipular el ADN al permitir cortar y pegar fragmentos de ADN para dar lugar a moléculas de ADN recombinante. Este avance ayudó a comprender los mecanismos de regulación y de expresión de los genes, o conocer su función.

Antes del desarrollo de la tecnología CRISPR existían otros sistemas de edición genética, pero menos eficientes y más costosos. Entre ellos encontramos las nucleasas con dedos de Zinc (ZFN), descritas por primera vez en 1996. Este sistema se basa en el empleo de endonucleasas artificiales, formadas al fusionar el dominio de corte de FokI a un dominio de unión al ADN en dedos de zinc (ZF), diseñado específicamente para reconocer secuencias específicas de ADN. La dificultad para generar dominios ZF capaces de reconocer secuencias específicas dio lugar al desarrollo de un sistema distinto, *Transcription Activator-Like Effector Nucleases* (TALENs). Este sistema acopla a la nucleasa FokI un dominio de unión al ADN basado en las secuencias TALE, secretadas por la bacteria *Xanthomonas*. La ventaja de este sistema sobre las ZFN radica en la facilidad para crear dominios de unión específicos a una secuencia de ADN. Se basa en matrices de 3 a 6 módulos que generan un dominio de unión con una especificidad de 9 a 18 pares de bases por monómero. Los motivos de unión al ADN de TALE están formados por repeticiones en tándem de 34 aminoácidos. Cada repetición reconoce y se une a una única base específica del ADN. Esta especificidad se determina por 2 aminoácidos variables, conocidos como diresiduo variable repetido. El descubrimiento de estos diresiduos permitió predecir y ensamblar los dominios de unión al ADN de TALE con mayor precisión. Esto llevó a aumentar el uso de TALEs con respecto a ZFN (Boch et al., 2009).

Tanto las nucleasas basadas en ZF como las basadas en TALEs utilizan dominios proteicos diseñados para reconocer y unirse a secuencias específicas de ADN (Torres-Ruiz & Rodríguez-Perales, 2017).

En 2012, se aprovechó el recién descubierto sistema inmune bacteriano para modificar el ADN, lo que llevó al desarrollo de CRISPR-Cas9 (Torres-Ruiz & Rodríguez-Perales, 2017). Este avance en la ingeniería genómica surgió a partir de la investigación de secuencias repetidas en bacterias que posteriormente se asociaron con un sistema inmunológico adaptativo que éstas usan para defenderse de infecciones virales y de ADN invasor.

2.1 Descubrimiento

Las bacterias son seres vivos que necesitan defenderse frente a las infecciones producidas por bacteriófagos. Es por esto que han desarrollado diferentes mecanismos de defensa ante los invasores, entre ellos el sistema CRISPR (Hryhorowicz et al., 2017). CRISPR es el acrónimo del inglés *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* (repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente espaciadas). Los loci CRISPR son regiones en el genoma de bacterias y arqueas que contienen clústeres CRISPR, compuestos por agrupaciones de repeticiones cortas (y parcialmente palindrómicas) y por espaciadores (funcionan como "memoria genética" de las infecciones anteriores) que se alternan en el genoma. Los primeros son elementos repetidos en patrones regulares y los segundos son secuencias variables que dependerán de infecciones previas.

Los loci CRISPR fueron observados por primera vez en 1987 (Ishino et al., 1987), pero no recibieron mucha atención hasta que se describieron loci idiosincrásicos similares en versiones preliminares de genomas (Jansen et al., 2002). Estos loci suelen estar flanqueados por genes asociados a CRISPR, conocidos como genes Cas (Barrangou & Marraffini, 2014).

2.2 Papel biológico

El papel biológico de este sistema se describió en 2005, al observarse que las secuencias espaciadoras presentaban homología con elementos genéticos extraños, incluidos virus y plásmidos (Bolotin et al., 2005; Mojica et al., 2005; Pourcel et al., 2005). Esta información dio lugar a la teoría de que CRISPR funciona como un sistema inmunológico adaptativo de bacterias y arqueas, que más tarde fue respaldada por pruebas de la función inmune mediada por este sistema. Así en 2007, se vio que los loci CRISPR de *Streptococcus thermophilus* adquieren nuevos espaciadores (Figura 1) derivados del ADN del fago invasor (Barrangou et al. 2007). Esta adquisición del ADN del fago invasor se produce en el extremo líder de una matriz CRISPR, por lo que esta inmunidad es hereditaria. Solo una minoría de la población tiene esta inmunidad codificada por CRISPR. Se da en baja frecuencia, pero estos pocos casos tienen una alta resistencia.

El CRISPR es un sistema de defensa inmunológica adaptativa que se encuentra en el 45% de los genomas bacterianos y en el 83% de los genomas de arqueas.

Proporciona una inmunización específica y adquirida contra elementos genéticos móviles exógenos. Estos elementos son segmentos de ADN que tienen la capacidad de moverse dentro de un genoma, o pueden transferirse entre organismos diferentes, como por ejemplo los virus, plásmidos, transposones, etc.

El funcionamiento del sistema CRISPR implica el reconocimiento de una secuencia específica mediado por ARN y dirigida principalmente frente a ADN diana, aunque a veces puede actuar sobre ARN.

Las secuencias de repeticiones cortas de los loci CRISPR pueden oscilar entre 23 y 55 nucleótidos, aunque la mayoría tienen entre 28 y 37 nucleótidos. El hecho de que las repeticiones sean palindrómicas significa que pueden formar estructuras de horquilla. En la mayoría de los casos los organismos tienen menos de 50 unidades de repeticiones, y uno o dos loci, o sitios donde se encuentra secuencias CRISPR. No obstante, existen especies que pueden contener más de 500 repeticiones y más de 19 loci.

En cuanto a los espaciadores tienen un tamaño de 21 a 72 nucleótidos, aunque la mayor parte de ellos oscila entre 32 y 38 nucleótidos (Barrangou & Marraffini, 2014).

Algunos virus o fagos tienen la capacidad para preparar al sistema inmune para una respuesta más rápida y efectiva, llamada *priming*. El "*priming*" en el contexto del sistema CRISPR de las bacterias es el proceso mediante el cual estas células se preparan para una respuesta más rápida y efectiva contra infecciones virales futuras. Cuando una bacteria es infectada por un bacteriófago, el sistema CRISPR captura fragmentos del ADN del virus y los incorpora en su propio genoma como espaciadores (Figura 1). La secuencia de ADN exógeno específica que forma parte del sistema (fragmento de ADN viral o plasmídico integrados en el genoma bacteriano) funciona como memoria inmunológica, y se define como protoespaciador. Si la bacteria se encuentra con el mismo virus nuevamente, el sistema CRISPR utiliza esta memoria para reconocer y cortar rápidamente el ADN del fago, impidiendo la infección. Así, el *priming* en el sistema CRISPR mejora la capacidad de la bacteria para combatir futuras infecciones por el mismo virus, similar a cómo la memoria inmunológica funciona en organismos superiores.

El protoespaciador va seguido de una secuencia específica de 2 a 6 nucleótidos en el extremo 3'. Esta secuencia, denominada secuencia PAM o motivo adyacente del protoespaciador, se encuentra en el ADN del virus o del invasor, justo al lado del

protoespaciador. Es una secuencia de nucleótidos corta, crucial para que el sistema CRISPR/Cas pueda identificar y cortar el ADN invasor.

El sistema CRISPR, desarrollado por las bacterias para protegerse de invasores como los bacteriófagos, utiliza una secuencia específica de 2 a 6 pares de bases en el ADN invasor, conocida como PAM, para reconocer el ADN invasor. El protoespaciador es la secuencia del ADN invasor que se adquiere como espaciador y está seguida de una secuencia PAM específica, que las bacterias utilizan como diana.

La presencia de esta secuencia PAM es necesaria para que la proteína Cas9 reconozca y corte el ADN en el lugar correcto. Por otro lado, para evitar la autofocalización, Cas1 y Cas2 deben unirse al protoespaciador y Cas9 reconocer a PAM, que al no estar presente en el ADN de la bacteria que alberga el sistema CRISPR, permite a la bacteria a distinguir entre su propio ADN y el ADN del invasor, asegurando que solo sea atacado el ADN invasor. Esto proporciona especificidad al sistema CRISPR. Por ello, si los científicos quieren buscar un fragmento que cortar, se busca primero una secuencia PAM dentro del genoma objetivo y luego diseñan un ARN que coincida con la secuencia junto a él.

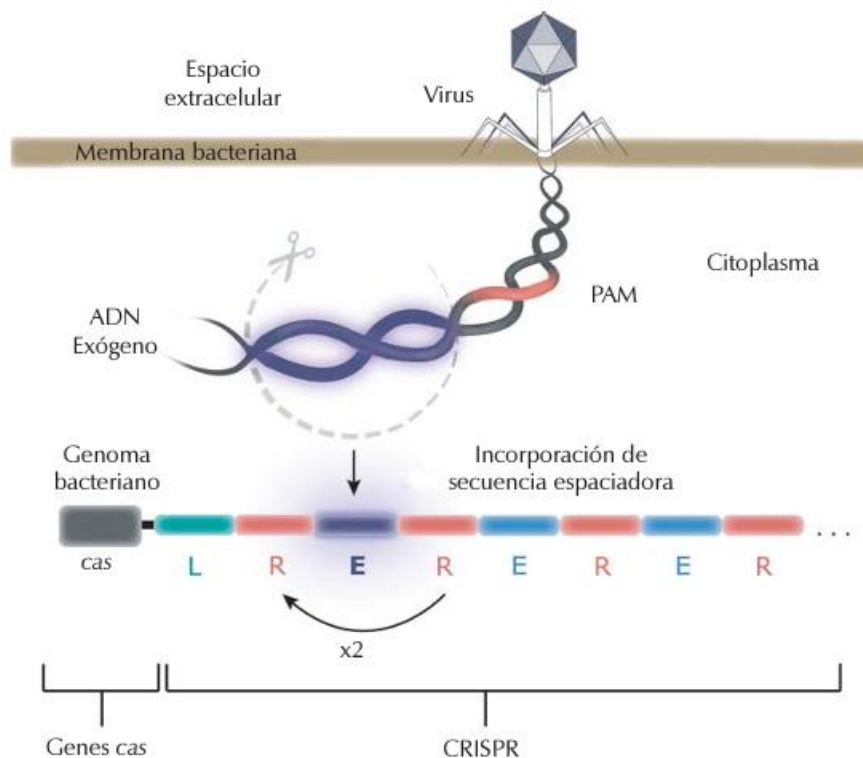


Figura 1. Esquema de la incorporación de secuencia espaciadora al genoma bacteriano. Las bacterias crean una memoria inmunológica gracias a la exposición previa a bacteriófagos, de los cuales integran

sus secuencias en el genoma bacteriano. En la figura, el virus introduce su material genético en el citoplasma bacteriano. La bacteria reconoce PAM e incorpora los nucleótidos próximos al PAM como un nuevo espaciador (E). Durante este proceso, se duplica la secuencia repetida (R) para flanquear la secuencia espaciadora. Dentro de la bacteria, su genoma codifica para Cas y CRISPR (Lammoglia-Cobo MF et al., 2016).

Por último, está el ADN diana; es la secuencia que es complementaria con la secuencia ARNcr o ARN guía generada por el complejo ARNcr-Cas. Cuando el ARNcr-Cas encuentra una secuencia de ADN diana complementaria junto a una PAM, se activa y corta específicamente el ADN invasor, desactivándolo y proporcionando inmunidad contra futuros ataques.

2.3 Componentes y mecanismo de acción

Nos vamos a adentrar en el fundamento de la técnica y su fundamentación teórica, para entender mejor la herramienta.

Las bacterias contienen en su ADN secuencias que usan como sistema de defensa ante invasores. Estas secuencias provienen de infecciones anteriores de la bacteria, en las cuales recoge trozos del código viral y los guarda en su propio genoma. Esta acción se lleva a cabo para crear de alguna forma una memoria inmunológica, de manera que cuando ésta vuelve a ser infectada, la bacteria lo identifica gracias a ARNg, que unido a Cas identifica al ADN patógeno.

Todo el proceso anteriormente mencionado se ha dividido en tres fases principales (Figura 2). Tras la infección se produce la **adaptación**; las bacterias adquieren nuevos espaciadores del código del invasor, es decir, ácido nucleico exógeno en el locus CRISPR como nuevos espaciadores. En segundo lugar, se da la **biogénesis de ARN CRISPR (ARNcr)**; Las matrices CRISPR, tanto repeticiones como espaciadores, del ADN bacteriano, son una base de datos que contienen información sobre las secuencias de ADN que forman parte del sistema CRISPR en distintos organismos. Se transcriben y posteriormente se procesan en pequeños ARNcr. En último lugar tenemos la **focalización u orientación**; los ARNcr guían a las nucleasas Cas para la escisión específica de secuencias homólogas. El hecho de que el ARNcr sea una copia de las secuencias de ADN viral adquirido durante la adaptación, hace que sean coincidentes, y por tanto exactas, de manera que son excelentes guías para que Cas destruya el ADN del invasor.

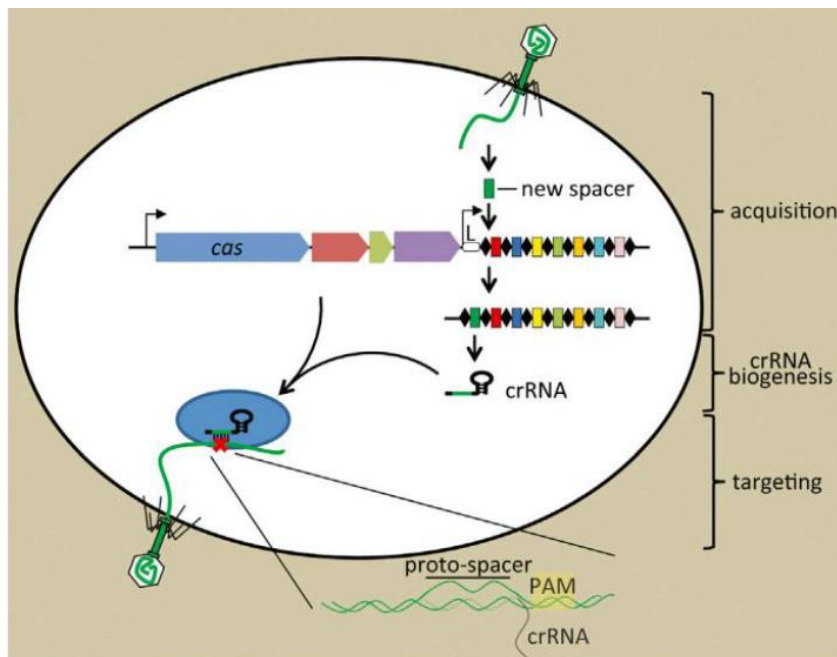


Figura 2. Las tres etapas de la inmunidad CRISPR. Las bacterias y arqueas usan el sistema CRISPR/Cas como un mecanismo de defensa contra invasores, como virus y plásmidos. i) Adquisición: El organismo adquiere nuevas secuencias de ADN de los invasores y los asume como espaciadores en su propio genoma. Esto proporciona “memoria inmunológica”. ii) Biogénesis del ARNcr: Los genes CRISPR se transcriben y procesan para formar el ARN guía o ARNcr que es complementario a los invasores y se une a proteínas Cas, formando complejos que reconocen y se unen al ADN invasor. iii) Interferencia: Los complejos ARNcr-Cas identifican y se unen al genoma del invasor gracias a la complementariedad de secuencia. Las Cas cortan y desactivan el ADN invasor, protegiendo al organismo (Barrangou & Marraffini, 2014).

2.4 Clasificación de los sistemas CRISPR/Cas

Según las nucleasas principales de los sistemas CRISPR/Cas, estos se han clasificado en tres tipos principales y 12 subtipos, basándose en su estructura y función (Figura 3). La propiedad principal que define los tipos y subtipos de CRISPR/Cas son los genes Cas y las proteínas que codifican. Estas proteínas son altamente diversas tanto genética como funcionalmente, lo que refleja la gran variedad de funciones bioquímicas que desempeñan en las diferentes etapas de la inmunidad mediada por CRISPR (Figura 4). (Barrangou & Marraffini, 2014).

Es importante que las proteínas Cas tengan capacidad de reconocimiento de ARN. Para ello tienen regiones específicas o motivos que les permite reconocer y unirse a ARN.

Estructuralmente, la mayoría de las proteínas Cas contienen dominios funcionales (con una estructura y función específica) que interactúan con ácidos

nucleicos (ARN y/o ADN), helicasas y nucleasas, encargadas de desenrollar y cortar el ADN, respectivamente.

Por otro lado, genéticamente, Cas1 y Cas2 forman parte de todos los tipos y subtipos, sin embargo, los tipos I, II y III tienen genes característicos de Cas3, Cas9 y Cas10, respectivamente. Los sistemas de tipo I tienden a aparecer en bacterias, los de tipo II solo se han identificado en ellas también y los sistemas de tipo III en arqueas e hipertermófilos.

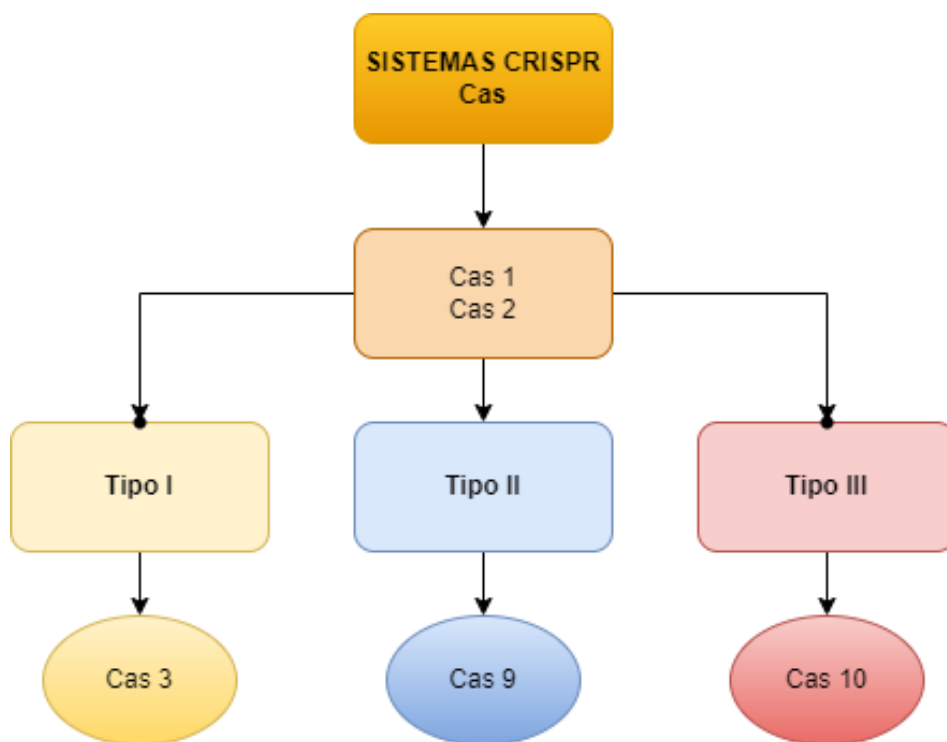


Figura 3. Esquema de las proteínas Cas que forman los sistemas CRISPR/Cas y las diferencias de las principales nucleasas según el tipo de sistema, ya sea I, II y III. Basado en (Barrangou & Marraffini, 2014).

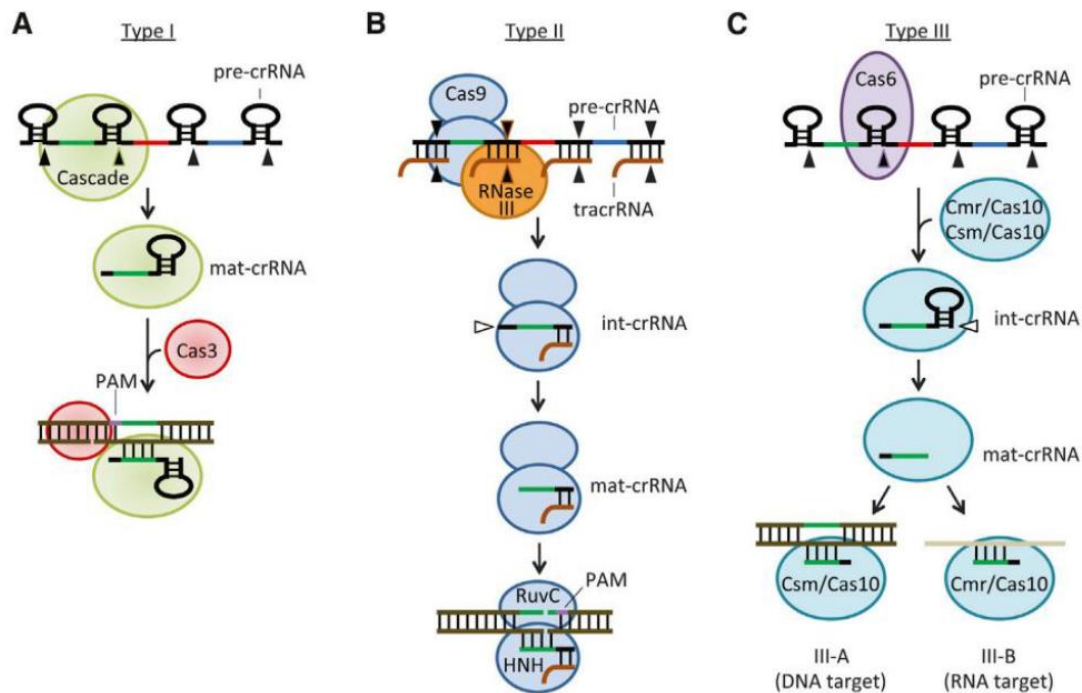


Figura 4. Mecanismo de biogénesis y focalización de ARNcr en los tres tipos de sistemas CRISPR Cas. En los sistemas CRISPR, el procesamiento del precursor de ARNcr sigue diferentes vías según el tipo de sistema. Los sistemas tipo I usan la Cas6, dentro del complejo CASCADE, procesan el pre-ARNcr, liberando ARNcr intermedios. Luego, el complejo CASCADE incorpora la Cas3 para escindir el ADN objetivo complementario al protoespaciador. Los sistemas tipo II cuando se procesa el pre-ARNcr se necesita del complejo pre-ARNcr-ARNtracr, seguido por la escisión del ARNbc por la ARNasa III del huésped. Cas9 recorta las secuencias espaciadoras y repetidas en los ARNcr intermedios de estos sistemas, dando lugar a los ARNcr maduros. Los sistemas tipo III usan la Cas 6 como los de tipo I para procesar el pre-ARNcr, genera ARNcr intermedio que se incorpora a cmr/Cas10 o csm/Cas10. En estos sistemas se da una mayor maduración del ARNcr ya que pierde parte de la secuencia por el extremo 3' (Barrangou & Marraffini, 2014).

Los tipos de sistemas también pueden clasificarse según dónde se encuentra la secuencia PAM. Según si se encuentra en un extremo del protoespaciador y está formado por un número de nucleótidos concreto se separa según la siguiente tabla:

	Extremo del protoespaciador	Nº de nucleótidos
Tipo I	5'	2 - 3
Tipo II	3'	2 - 5
Tipo III	No se conoce	No caracterizados

2.5 Aplicación del sistema CRISPR/Cas a la edición genómica

La fundamentación del método CRISPR radica en su capacidad para dirigirse de manera precisa y exacta a secuencias concretas de un ADN y realizar modificaciones en estas. Esto se consigue mediante la conjugación de distintos componentes que dan lugar a esta excepcional maquinaria.

Para llevar a cabo su función en el laboratorio, hay que diseñar una molécula guía de ARN: ARNsg (ARN guía sintético). Éste en el proceso en bacterias es el que anteriormente hemos nombrado con ARNcr. Su función, igual que en bacterias será guiar la nucleasa a la secuencia específica del ADN que se desea modificar. El ARN guía se diseña de manera que sea complementario al ADN objetivo, permitiendo una unión específica entre ambos.

Posteriormente, el ARNg unido de manera específica al ADN diana, guía a la proteína Cas hacia la secuencia precisa en el genoma donde se realizará el corte. Una vez que la proteína Cas se une al ARNg y reconoce el ácido nucleico objetivo, crea un corte de doble hebra en la molécula de ADN en el sitio objetivo.

Tras el corte, el organismo intentará reparar el ADN usando un proceso de reparación natural (Unión de extremos no homólogos (NHEJ), unión de extremos mediada por microhomología (MMEJ) y reparación dirigida por homología (HDR)). Esta técnica es útil para suprimir genes no deseados, sin embargo, este proceso de reparación natural puede, a veces, inducir la inserción de un nuevo segmento de ADN.

3. Técnica CRISPR/Cas9

En el mundo de los sistemas CRISPR, destaca especialmente CRISPR/Cas9 debido a su versatilidad, eficacia y amplio rango de aplicaciones en la edición genética. Este sistema es derivado del sistema inmune de las bacterias y ha revolucionado la biotecnología por su capacidad de realizar cortes precisos de manera sencilla y económica.

Cas9 es el gen característico de los sistemas tipo II. Cas9 es una proteína multidominio completa y ejerce las funciones de complejos efectores, objetivo de escisión del ADN y también es responsable de la maduración del ARNcr (Nishimasu et al., 2014). La endonucleasa Cas9 necesita del ARN guía, con la que forma una

estructura esencial necesaria para llevar a cabo su función de reconocimiento (Figura 5).

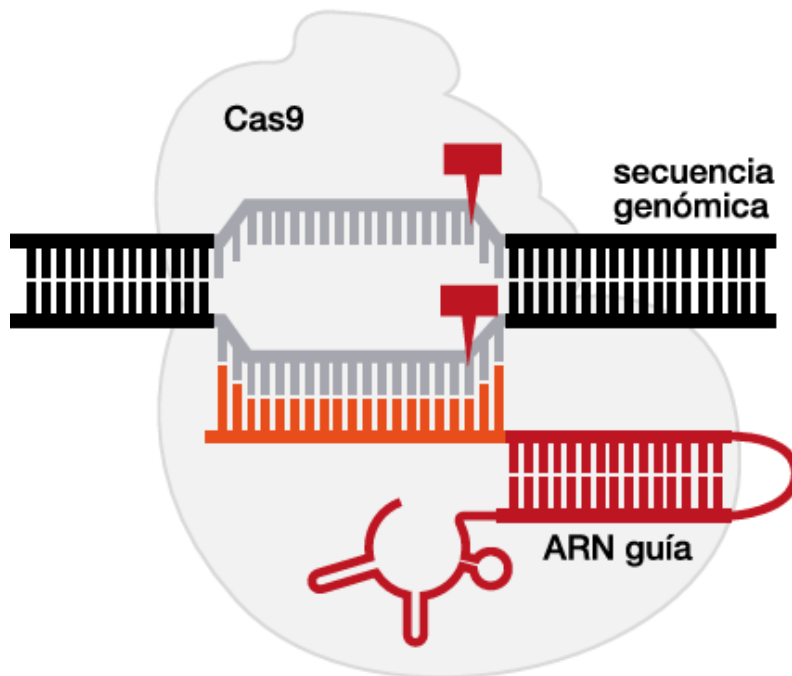


Figura 5. Esquema gráfico del sistema CRISPR/Cas9. La endonucleasa Cas9 corta en posiciones precisas de las dos cadenas de ADN (formas geométricas) dirigida por una pequeña molécula de ARNg que se aparea con la secuencia de ADN del gen que se quiere editar (Giono, 2017).

Se piensa que este sistema evolucionó a partir de la recombinación entre genes de tipo I y Cas9 (Chylinski et al., 2014). Además de Cas9, incluye los genes Cas1 y Cas2, que son comunes en todos los tipos de sistemas CRISPR, así como genes para ARNtracr.

Los loci tipo II contienen uno o dos genes de un ARN que, junto con el ARNg, forman la estructura que guía Cas9 al sitio objetivo, el ARNtracr. Éste es parcialmente homólogo a CRISPR y se usa junto con la RNasa III celular para procesar el pre-ARNcr.

La proteína Cas9 tiene dos dominios de nucleasa esenciales para la escisión, el primero es similar a RuvC y el segundo es el dominio HNH, en medio de la proteína (Figura 6).

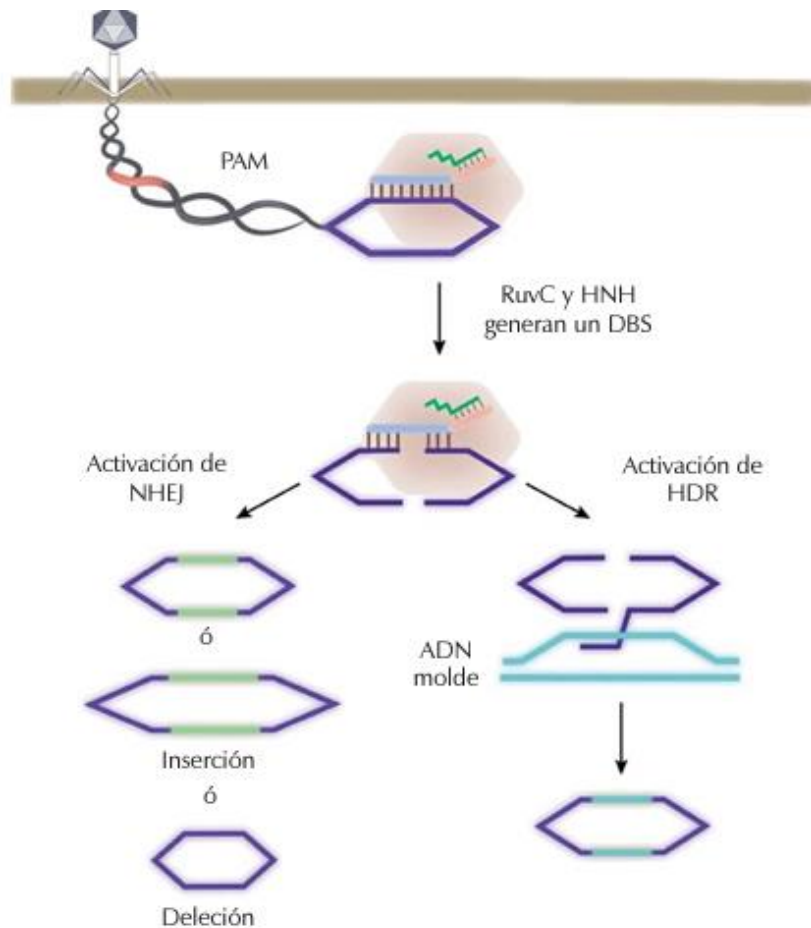


Figura 6. CRISPR/Cas como sistema de defensa. Ante una segunda infección, la bacteria activa el sistema CRISPR/Cas, donde el ARNcr reconoce la secuencia exógena adyacente a PAM y forma un complejo ADN-ARN. La enzima Cas, a través de sus dominios RuvC y HNH, corta ambas hebras de ADN. Estos cortes se reparan mediante dos mecanismos: NHEJ; es impreciso y puede alterar el marco de lectura, y HDR; usa un ADN molde para insertar una secuencia específica (Lammoglia-Cobo MF et al., 2016).

Se ha visto que los transposones, secuencias que tienen la capacidad de moverse dentro del genoma, podrían ser la fuente de dominio de nucleasa de Cas9, ya que los transposones codificados por nucleasa y Cas9 comparten similitudes estructurales y funcionales.

Los sistemas tipo II se clasifican en tres subtipos con sus genes característicos: II-A; contiene el gen *csn2*, II-B; tiene como gen característico el gen *Cas9*, pero contiene también *Cas4* además de *Cas1* y *Cas2*, II-C; contiene solo tres genes: *Cas1*, *Cas2* y *Cas9* en su operón.

Los sistemas como el tipo II tienen un mecanismo de acción distintivo: éstos forman un dúplex entre ARNtracr y una parte de la región repetitiva del pre-ARNcr, donde ocurre la escisión inicial. Esta escisión inicial se ve facilitada por la presencia de Cas9 y catalizada por la RNasa III. Estos sistemas han sido explorados recientemente para ver sus aplicaciones en edición genética y biotecnología, debido a su facilidad de uso, precisión, versatilidad, eficiencia y bajo costo.

El sistema CRISPR/Cas, que actúa como un sistema inmune adaptativo en bacterias y arqueas, se basa en dos componentes principales: la matriz CRISPR y los genes Cas (CRISPR-associated). La matriz CRISPR contiene repeticiones directas palindrómicas separadas por regiones espaciadoras de 30 a 40 pares de bases, que funcionan como memoria inmunológica al provenir de virus invasores. Los genes Cas codifican proteínas, generalmente nucleasas, y están organizados en operones con otros elementos reguladores y de procesamiento. El mecanismo de defensa del sistema CRISPR/Cas se divide en tres etapas: adaptación, biogénesis e interferencia.

3.1 Adaptación

Es la etapa en la que las proteínas Cas, unidas al ARNg, se unen al ADN bicatenario después de que encuentran al PAM (motivo adyacente al protoespaciador) e introducen dos roturas bicatenarias en esa región. Cuando se produce esta rotura en el genoma del patógeno se le da el nombre de protoespaciador al fragmento liberado, el cual después se introduce en la matriz CRISPR del hospedador. La secuencia se introduce por completo gracias a la actuación de la maquinaria del hospedador que repara la matriz CRISPR. Cuando esta sufre la reparación, se dice que la matriz ha adquirido o incorporado un nuevo espaciador.

Para este proceso de adquisición o incorporación de espaciadores existen dos vías posibles: la vía ingenua y la vía preparada. La principal diferencia es que en la vía ingenua no se ha reconocido antes el patógeno, ya que no hay un ataque previo. Sin embargo, en la vía preparada el patógeno ya ha atacado previamente, lo cual le da su nombre a la vía. En ambas las proteínas Cas1 y Cas2 son esenciales.

En la vía de adquisición ingenua, el organismo no ha sido previamente atacado, y las proteínas efectoras Cas1 y Cas2 trabajan juntas para reconocer e integrar el material genético del patógeno invasor. Luego, estas secuencias capturadas se

integran en la matriz CRISPR del organismo huésped como nuevos espaciadores, lo que proporciona la memoria inmunológica para futuras invasiones.

Por otro lado, en la vía de adquisición preparada, el organismo ya ha sido previamente atacado por el patógeno, y las proteínas Cas1 y Cas2 que integran los espaciadores, los cuales ya están reconocidos por ciertos elementos en los motivos adyacentes al protoespaciador (PAM).

Cas1 y Cas2 son proteínas esenciales en el reconocimiento y adquisición de espaciadores en el sistema CRISPR Cas. Ambas juntas forman el complejo Cas1 4-Cas2 2, en este complejo la proteína Cas1 tiene un dominio de reconocimiento PAM. Este complejo se une al protoespaciador y cataliza un proceso químico en el que un enlace fosfodiéster en el ADN objetivo reacciona con el grupo hidroxilo (-OH) en el extremo 3' de la secuencia de ADN, formando una unión nueva y permitiendo la integración del espaciador.

Existen sistemas que carecen de las proteínas Cas1 y Cas2. En este caso, tienen que desarrollar otros mecanismos de adaptación, como por ejemplo el sistema IF de las *Pseudomonas aeruginosa*. Para su función, estos sistemas necesitan de otra proteína Cas. El sistema IB requiere de Cas4 para lograr la adaptación. En el caso de los sistemas tipo II-A, Cas9 recluta las proteínas Cas1, Cas2 y csn2 para la integración de nuevos espaciadores. Cas9 es la responsable de identificar la región PAM en el protoespaciador.

A la adquisición del espaciador le sigue la biogénesis del ARNcr.

3.2 Biogénesis del ARNcr

El proceso de biogénesis es diferente en el caso de los sistemas de clase tipo II. En ellos implica dos pasos de escisión que son catalizados por la RNasa III y el ARNcr activador trans (ARNtracr), el primero dentro de las repeticiones y el segundo dentro de los espaciadores. Los ARNtracr son los ARN no codificantes que tienen interacción con la unidad estructural repetida de la transcripción del pre-ARNcr.

Para llevar a cabo este paso, la matriz CRISPR se debe transcribir en pre-ARN CRISPR. Esto es el comienzo de la biogénesis del ARNcr, la ARN polimerasa usa la región promotora asociada con el locus CRISPR para sintetizar una cadena de ARN

que contienen secuencias que corresponden a los espaciadores y las secuencias directas repetidas que forman parte de la matriz CRISPR.

La transcripción da como resultado el pre-ARNcr, precursor del ARNcr que contiene secuencias de espaciadores intercaladas con repeticiones. Este precursor debe ser procesado para generar el ARNcr. Generalmente es procesado por Cas6, una enzima que corta en sitios específicos dentro de las repeticiones, generando ARNcr individuales por cada espaciador.

Una vez que ya se han procesado los ARNcr individuales se le unen a cada uno de ellos una proteína Cas9 que da lugar a un complejo ARN guía-Cas9. Esta interacción es crucial para dirigir la actividad de la Cas9 hacia el ADN objetivo complementario al espaciador presente en el ARNcr. Cuando el ARNcr se une a Cas9, forma un dúplex de ARN. Este se sitúa entre el ARNcr y la secuencia complementaria en el ADN objetivo. Este dúplex es necesario para dirigir la actividad de la nucleasa Cas9 y estabilizar el complejo.

Para llevar a cabo su función, el complejo ARNg-Cas9 debe ser activado. Para la activación debe encontrarse el complejo con la secuencia complementaria en el ADN objetivo junto a una secuencia PAM. La secuencia PAM es esencial para la especificidad de la unión y activación de ARNg-Cas9.

Más tarde, cuando el complejo ARN guía-Cas9 es activado, induce una escisión en el ADNbc del huésped mediante la RNasa III, reconoce y corta específicamente el dúplex de ARN en un sitio determinado. Esta escisión es un paso crítico para la maduración del ARNcr.

La escisión por la RNasa III genera un ARNcr intermedio que contiene la secuencia complementaria al espaciador del CRISPR y necesita un procesamiento adicional por la nucleasa Cas9 para convertirse en un ARNcr maduro y funcional. Este ARNcr maduro pierde su etiqueta de nucleótidos en el extremo 5' y retiene 20 nucleótidos de la secuencia repetida, elementos esenciales para el reconocimiento y la dirección de la actividad de Cas9 hacia el ADN diana. Esto permite una edición precisa del genoma, posibilitando la inserción, eliminación o modificación de secuencias específicas de ADN.

3.3 Interferencia

La interferencia es la etapa final de la respuesta inmune adaptativa CRISPR en la cual el ADN objetivo es reconocido por CRISPR a través del ARNcr maduro unido a la secuencia objetivo y es escindido por las nucleasas efectoras. Los sistemas de tipo II son los únicos que requieren un único complejo para la interferencia del objetivo. Por otro lado, los tipos I, II y V reconocen característicamente regiones PAM.

En los sistemas tipo II, el dúplex ARNcr-ARNtracr guía a la Cas9 para introducir una rotura de ADN de doble cadena en el objetivo. El mecanismo molecular de la interferencia se puede ver en la figura 7.

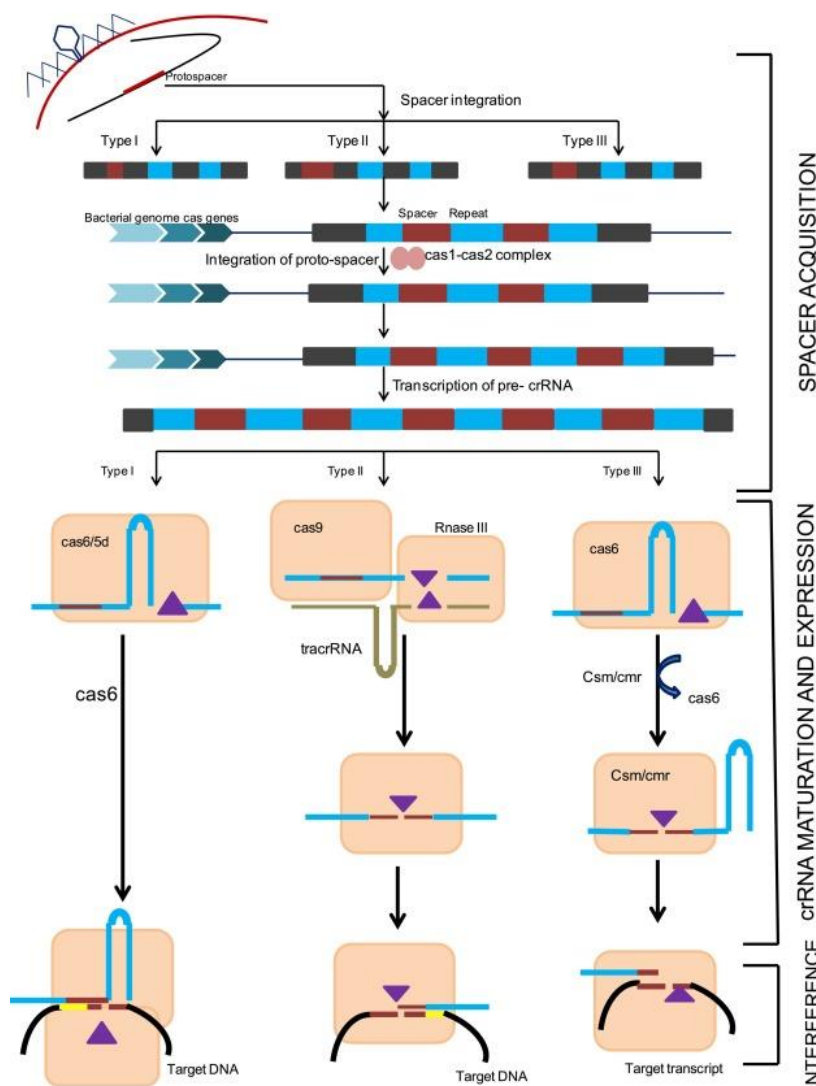


Figura 7. Se ve representado el mecanismo molecular del funcionamiento de los sistemas CRISPR/Cas tipo I, II y III. Estos sistemas llevan a cabo su función en tres pasos principales: 1) Adaptación. En ella se da el reconocimiento del protoespaciador y su incorporación al locus CRISPR por el complejo Cas1/Cas2. Se reflejan cuadros negros que corresponden a las secuencias cortas repetidas y los

demás cuadros azules y rojos que corresponden a las secuencias espaciadoras. Todos ellos forman la matriz CRISPR. El reconocimiento depende de PAM en el caso de los tipos I y II, sin embargo, en el tipo III es independiente de ella. 2) Biogénesis de ARNcr. Es la expresión del locus CRISPR en pequeños pre-ARNcr y posteriormente en ARNcr maduro, según el tipo de sistema involucra la formación de estructuras específicas. Los sistemas de tipo I necesitan el complejo CASCADE para unirse al pre-ARNcr y forma una estructura en forma de horquilla. Para escindir esta unión usa Cas6. Los sistemas tipo II carecen del complejo CASCADE, forman otro complejo que une ARNcr y pre-ARNcr, el cuál será escindido por la RNasa III en presencia de Cas9. Los sistemas tipo III necesitan la Cas6 para procesar el ARNcr que se transfiere a las proteínas Cas csm/cmr. Cada ARNcr se compone de un espaciador, un complejo CRISPR/Cas parcial y proteínas Cas. 3) Interferencia. Este último paso implica la identificación del ADN objetivo basado en la complementariedad del espaciador del ARNcr y el ADN objetivo. Luego se da la escisión mediante nucleasas, los sistemas tipo I usan Cas3, los sistemas tipo II usan Cas9 y los sistemas tipo III necesitan a csm para llevarla a cabo (triángulos morados). Si el sistema es tipo IIIB implica cmr (Bhatia et al., 2023).

3.4 Reparación

Posteriormente a la entrega del sistema mediante los métodos comentados, el siguiente paso es la reparación. CRISPR lleva a cabo su función generando DSB en un sitio específico del ADN. Después del corte, las células pierden la capacidad de sobrevivir si éste no se ve reparado por un mecanismo. Algunas de las formas de reparación son:

3.4.1 Unión de extremos no homólogos (NHEJ).

Es la vía predominante de reparación de DSB en mamíferos. Tiene lugar a lo largo del ciclo celular, a gran velocidad. Los extremos que han quedado después de la rotura se unen y protegen rápidamente mediante el heterodímero Ku70-Ku80 (Ku). Después, Ku se encarga de alistar y activar ADN-PKcs, la subunidad catalítica de la proteína quinasa dependiente de ADN. La actividad de esta subunidad es esencial para este método de reparación. Además, Ku recluta los factores NHEJ XRCC4, XLF y ADN ligasa IV (LIG4). Inicialmente, estos factores forman un complejo sináptico de largo alcance que une los extremos. La autofosforilación de ADN-PKcs conduce a su disociación del ADN y a la transición del complejo a uno de corto alcance, donde los extremos están alineados estrechamente para permitir el procesamiento final y la consecutiva ligadura por LIG4. El complejo sináptico de corto alcance asegura que los extremos del ADN se ligan tan pronto como se vuelven compatibles, limitando así el procesamiento de los extremos del ADN y minimizando la mutagénesis.

3.4.2 Reparación dirigida por homología dependiente del donante (HDR).

La reparación homóloga dirigida (HDR) usa plantillas de ADN homólogas para reparar roturas de doble cadena (DSB) y mayormente precisa (Figura 8). Sin embargo, si no se regula adecuadamente, puede causar reordenamientos genómicos e inestabilidad. Para iniciar HDR, se requiere una extirpación extensa de los extremos del ADN, facilitada por el complejo MRN-CtIP y extendida por enzimas como EXO1 y DNA2. Esto crea colas de ADN de una sola hebra (ssDNA) que buscan secuencias homólogas para usar como plantillas de reparación. En la edición genómica, se utilizan diferentes tipos de plantillas de ADN, como ADN de doble hebra (dsDNA), oligodesoxinucleótidos de hebra simple (ssODN) y plantillas cromatizadas. La reparación con dsDNA y ssODN puede ser dependiente o independiente de RAD51, respectivamente.

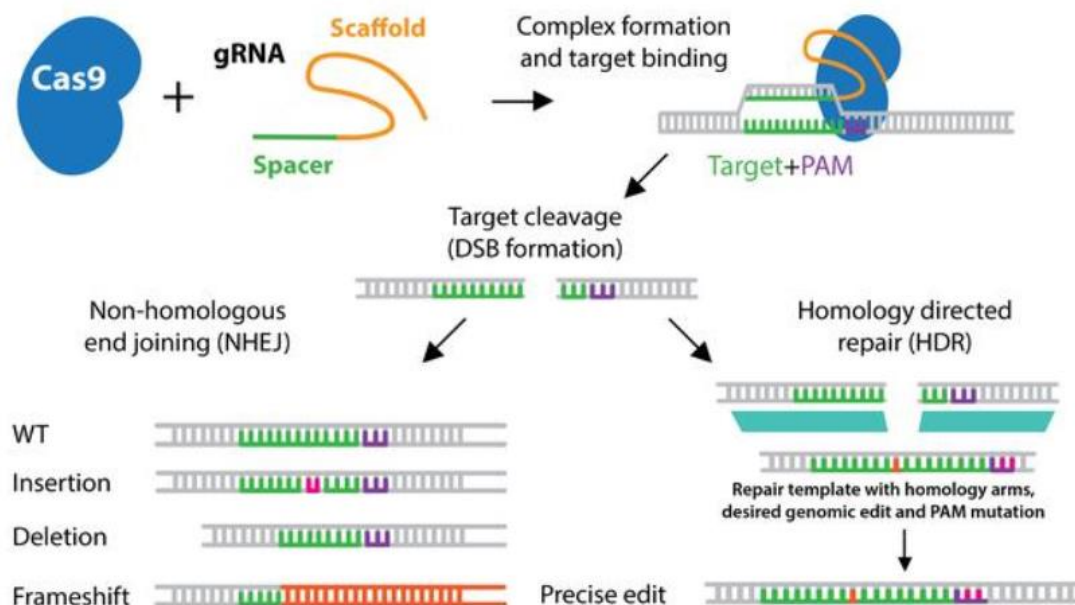


Figura 8. Reparación de las roturas inducidas por CRISPR/Cas9. Una rotura de doble cadena (DSB) en la secuencia objetivo se puede reparar mediante vías de unión de extremos no homólogos (NHEJ) o reparación dirigida por homología (HDR) (Dow, 2015).

3.5 Administración del sistema CRISPR/Cas al huésped

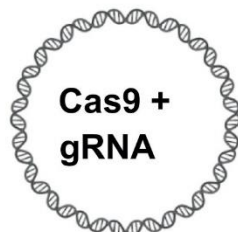
Los pasos anteriormente nombrados se dan en los sistemas en bacterias. Sin embargo, para su uso en ingeniería genética se debe realizar la administración de este sistema al organismo que contiene el ADN diana. La entrega implica la selección cuidadosa del método de entrega más adecuado según el tipo de células, el objetivo de estudio o tratamiento. No obstante, antes de utilizar el sistema CRISPR/Cas, es

fundamental diseñar cuidadosamente el experimento, eligiendo una enzima Cas adecuada y un ARN guía (ARNg) optimizado. La secuencia PAM (Protospacer Adjacent Motif) es crucial al seleccionar la enzima Cas, ya que determina los posibles sitios de edición en el genoma.

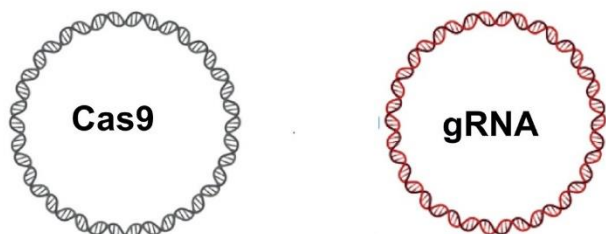
Generalmente, se utilizan dos enzimas Cas principales: Cas9 y Cas12. Cas9, la primera en ser utilizada y aún la más popular, requiere un ARNg que puede ser de dos tipos: un ARN guía único (ARNsg) o un ARNg de dos partes, compuesto por el ARNcr y el ARNtracr. Por otro lado, Cas12a utiliza un ARNg de una sola molécula, también conocido como ARNcr (Bhatia et al., 2023).

El siguiente paso es la transfección, que es el proceso de introducir ADN o ARN en las células. A través del uso de ADN plasmídico en la transfección, se pueden codificar tanto la proteína Cas9 como el ARNg. Alternativamente, Cas9 puede administrarse como ADN plasmídico mientras que el ARNg se introduce como un oligonucleótido de ARN. Existen diversas formas de entregar Cas9, como se ilustra en la siguiente figura (Figura 9).

All in one plasmid expressing Cas9 and guide RNA.



Separate plasmids expressing Cas9 and guide RNA.



Separate plasmids expressing Cas9 nickase and guide RNAs.

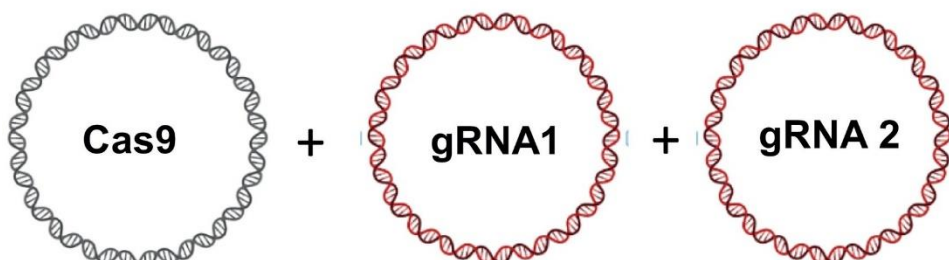


Figura 9. Diferentes formas de entrega de Cas9 al sistema anfitrión. En el primer plásmido vemos un todo en uno, expresa tanto Cas9 como el ARNg. Es una perspectiva muy práctico y eficiente. Por otro lado, el segundo caso es un plásmido separado, expresa la nickasa Cas9 y los ARNg, es menos eficiente en cuestión de tiempo. El tercer caso Cas9 se administra como ADN plasmídico y el ARNg como oligonucleótidos de ARN sintéticos o transcritos *in vitro* (Bhatia et al., 2023).

La enzima Cas9 en su forma silvestre contiene dos dominios de endonucleasas que, cuando se programan con ARNg, escinden el ADN objetivo en ambas hebras, creando roturas de doble cadena en el ADN objetivo. Para generar mellas, se introduce la mutación D10A, transformando Cas 9 en nickasa D10A, o Cas9n, que corta en lugar de escindir el ADN para producir roturas monocatenarias, y la posterior reparación a través de HDR(homology directed repair) (Ran et al., 2013). Este mutante de Cas9, se usa como una herramienta versátil y refinada que mejora la seguridad de las técnicas de edición del genoma. Se puede usar con ARNg emparejados para dirigirse a hebras opuestas, mejorando así la precisión de corte. Este método es ventajoso porque permite la entrega sencilla de ARNm y ARNg como un único reactivo.

La edición del genoma basada en ARN es altamente específica y presenta varias ventajas importantes. Una de las principales ventajas es la rápida expresión génica, lo que permite que los cambios deseados se realicen en un corto período de tiempo. Además, al no integrar ADN adicional en el genoma de la célula, se elimina el riesgo de mutagénesis por inserción, lo que hace que este método sea más seguro.

Para lograr una edición genómica rápida y eficiente, se puede utilizar la proteína Cas9 purificada en combinación con ARN guía (ARNg) para formar un complejo ribonucleoproteico (RNP). Este complejo RNP permite una entrega precisa y directa del sistema de edición al ADN diana, facilitando la realización de cortes específicos en el genoma sin la necesidad de que el ADN plasmídico se integre en el genoma de la célula. Este enfoque no solo aumenta la eficiencia de la edición, sino que también reduce el riesgo de efectos secundarios no deseados, haciendo que la técnica sea más controlada y segura (Bhatia et al., 2023).

La entrega de los componentes del sistema es una tarea esencial. Por problemas asociados con la carga de plásmidos (problemas de sincronización, citotoxicidad, actividad prolongada y eficiencia de edición variable), la entrega CRISPR RNP es óptima para la tarea, ya que RNP se activan rápidamente, tienen varios vehículos de

entrega, mayor precisión y menos efectos fuera del objetivo. Se lleva a cabo mediante diferentes métodos incluidos virales, no virales y físicos (Figura 10).

3.5.1 Entrega viral

La administración viral es uno de los métodos más usados para conseguir la expresión de Cas9, ya que los virus son muy eficientes al invadir células e inducir proteínas del invasor dentro del huésped. Con el avance de las tecnologías de ingeniería genética, se ha hecho posible eliminar los genes responsables de la replicación (genes rep) de algunos virus y reemplazarlos por un transgén de interés. Esta técnica se usa principalmente en el ámbito terapéutico. Como resultado, el virus modificado puede introducirse en la célula huésped y expresar el transgén insertado, pero ya no puede replicarse ni propagarse a nuevas células, quitando así el riesgo de que el virus se replique y cause infecciones adicionales (Bhatia et al., 2023).

Para asegurar que estos transgenes se expresan a largo plazo se usan tres vectores virales principalmente: los vectores adenoasociados (AAVV), los vectores adenovirales de tamaño completo (AdV) y los vectores lentivirales (LV).

	AAVV	AdV	LV
Tamaño de carga que puede entregar	Pequeños, demasiado como para transportar a Cas9 y al ARNg	El tamaño de carga no limita la entrega, por ello se les llama de tamaño completo	Pueden entregar la carga de cualquier tamaño
Eficiencia de infección	No pueden infectar en división Generan una respuesta leve en el huésped	Tienen la capacidad de infectar células en división y no división	Muy eficientes en infectar en división y no división
Integración en el genoma del huésped	No se integran	No se introducen en el huésped	Hay posibilidad de que se integre (implicaciones de seguridad asociadas)

Aplicaciones actuales	Ataca células endoteliales vasculares de la retina humana y del cerebro	- Silencia SMAD3 de los fibroblastos del pulmón humano y las células endoteliales bronquiales - Generar modelos de ratón con cáncer de pulmón impulsado por EML4-ALK	- Tratar el carcinoma hepatocelular humano eliminando el gen HIF-1 α - Atacar a Kras alleles y suprimir el crecimiento canceroso
Otros	No patógenos Más adecuados para fármacos (no causan enfermedades en humanos)	Pueden causar respuestas inmunes indeseables y efectos fuera del objetivo (daños al huésped).	Son retrovirus

Tabla 1. Diferentes vectores virales para la entrega de CRISPR/Cas9.

Los vectores virales son prometedores para la administración de CRISPR debido a su capacidad de reorientarse hacia casi cualquier tejido o tipo de célula y a su versatilidad para administrarse local o sistémicamente. La opción preferida para la edición del genoma in vivo han sido los AAVV, con ortólogos más pequeños de Cas9, más fáciles de empaquetar, ya que AAVV no soporta mucha carga de entrega (Torres-Ruiz & Rodríguez-Perales, 2017).

3.5.2 Entrega no viral.

Los sistemas de entrega no virales pueden transportar ADN plasmídico, ARNm y RNP. Son una alternativa adecuada para el cultivo celular, ya que tienen altos niveles de expresión, reproductividad y velocidad. Los sistemas de entrega no virales más usados son los métodos físicos: la nucleofección, electroporación y transfección con agentes liposomales. Éstos son especialmente útiles porque su naturaleza transitoria,

no se integran en el genoma, los hace preferibles sobre sistemas integradores, como los lentivirus, que pueden tener efectos fuera del objetivo.

La electroporación es el sistema más común debido a su aplicabilidad en una amplia gama de células, incluida la modificación del genoma *ex vivo* en entornos clínicos. Sin embargo, su eficacia varía según el tipo de célula. Aunque la electroporación es ampliamente aplicable, su eficacia en entornos *in vivo* es limitada. Últimamente, la entrega hidrodinámica se ha propuesto como una alternativa para la administración no viral y ha demostrado su efectividad en el hígado de ratones. Este método se basa en la inyección rápida de una gran cantidad de solución que contiene el material genético, aprovechando el aumento temporal de la presión hidrodinámica en los vasos sanguíneos para facilitar la entrada del material en las células.

Por otro lado, sus usos pueden asociarse con problemas cardiovasculares y hepáticos, lo cual plantea preocupaciones sobre su aplicación.

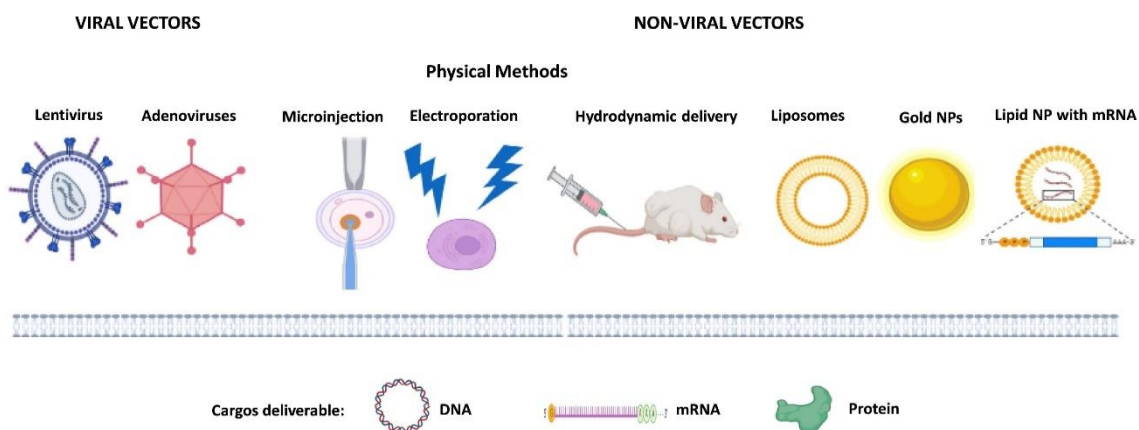


Figura 10. Diferentes métodos virales, no virales y físicos para la administración de sistemas CRISPR/Cas al huésped (Bhatia et al., 2023).

3.6 Evolución lamarckiana vs. darwiniana

Los loci CRISPR modificados pueden transmitirse a la siguiente generación, lo que ejemplifica la evolución lamarckiana (Barrangou & Marraffini, 2014).

Esta heredabilidad de las características adquiridas y los patrones de evolución de CRISPR/Cas muestran una tendencia no aleatoria en el muestreo y adquisición de nuevos espaciadores, que funcionan como memoria genética, aunque esto no siempre es así, en algunas especies la adquisición de nuevos loci sí que es aleatoria. Cuando se da una adquisición no aleatoria, esto es beneficioso para el huésped.

inmunizado, ya que este rasgo fenotípico se transmite a la línea celular superviviente, gracias a la adquisición de nuevos espaciadores.

Esta adquisición heredada proporciona resistencia a fagos, lo que contrasta la evolución lamarckiana y darwiniana.

Los loci CRISPR representan un ejemplo auténtico de evolución lamarckiana. Esta evolución se evidencia en la relación directa entre el genotipo adquirido y el cambio fenotípico correspondiente, esencial en el proceso evolutivo. Además, las señales ambientales desencadenan cambios genéticos hereditarios que proporcionan adaptación, respaldando así el argumento lamarckiano. La coexistencia natural de una diversidad de genotipos CRISPR respalda la naturaleza lamarckiana matemáticamente predicha de la evolución del genotipo CRISPR en poblaciones mixtas. Aunque algunos aspectos coinciden con la evolución darwiniana, la mayor aptitud de las variantes que han adquirido nuevos espaciadores y el conocimiento preciso del tipo de evolución que los sistemas CRISPR proporcionan a las bacterias evidencian la complejidad del proceso evolutivo en este contexto.

4. Consecuencias y aplicaciones CRISPR/Cas9

4.1 Consecuencias de CRISPR/Cas9

4.1.1 Inserciones y reemplazo de genes

Como se ha comentado anteriormente, existen dos mecanismos de reparación principales: NHEJ y HDR. NHEJ tiene mayor actividad y tiene mayor probabilidad de error que HDR. Debido a su mayor probabilidad de error, cuando se usa NHEJ se producen tanto inserciones como deleciones (Figura 11) (Adhikari & Poudel, 2020). Esto puede dar lugar a mutaciones. Algunas de ellas son útiles en investigación genética para estudiar la función de genes y crear modelos animales. En terapia génica, permiten la corrección de genes defectuosos para tratar enfermedades genéticas. En agricultura, pueden proporcionar resistencia a enfermedades y plagas, reduciendo el uso de pesticidas. Sin embargo, debido a su naturaleza aleatoria, se prefiere el uso de HDR para ediciones más precisas.

La tecnología CRISPR/Cas9 ha sido fundamental en el desarrollo de cultivos resistentes a herbicidas mediante la inserción y reemplazo de genes. Por ejemplo, la sustitución de aminoácidos clave en las enzimas ALS y EPSPS puede conferir

resistencia a herbicidas como las sulfonilureas. Se ha desarrollado arroz resistente a herbicidas mediante diversas técnicas, como la alteración de la ADN ligasa 4, la focalización de intrones, el uso de dos ARN guía (ARNsg) y ARN quiméricos que transportan secuencias de plantilla de reparación y el sitio objetivo (Butt et al., 2017)..

En resumen, la elección entre NHEJ y HDR en la edición genética con CRISPR/Cas9 depende de la necesidad de precisión. NHEJ es útil para generar mutaciones y estudiar funciones de genes, mientras que HDR es preferido para inserciones y reemplazos de genes más precisos, siendo clave en aplicaciones agrícolas y terapéuticas avanzadas.

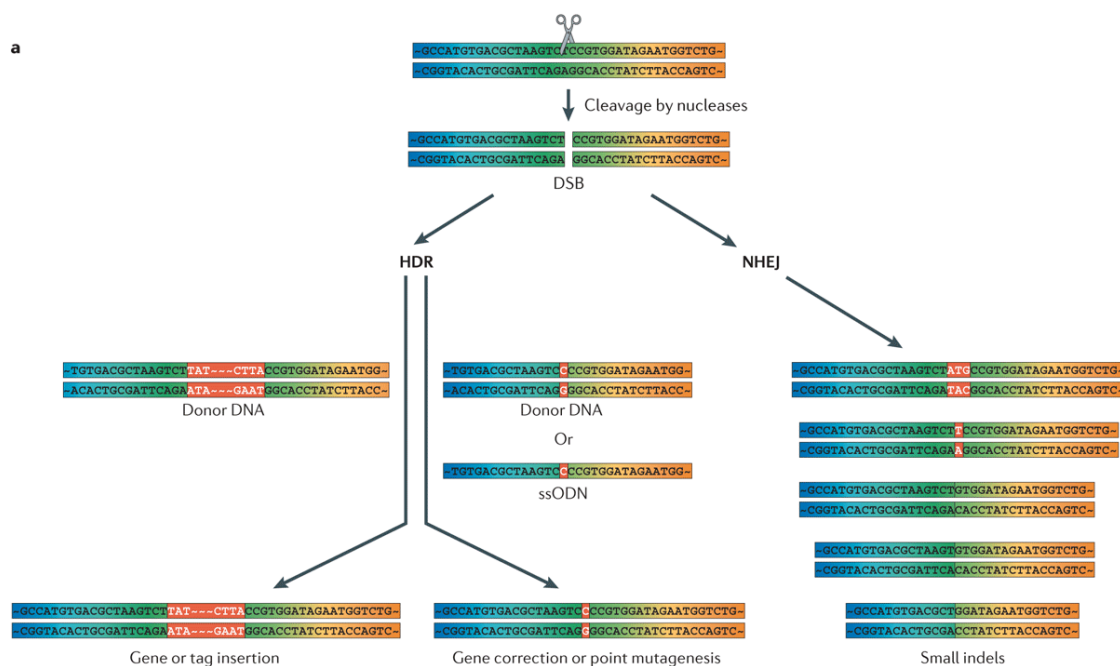


Figura 11. Proceso de inserción cromosómica. Las roturas de doble cadena (DSB) inducidas por las nucleasas pueden repararse de dos formas. Una de ellas es la reparación dirigida por homología (HDR), que requiere de un ADN donante o un ssODN (oligodesoxinucleótido monocatenario) con brazos homólogos. Ésta puede resultar en la inserción, corrección o punto de cambio de nucleótidos. La otra forma es la unión de extremos no homólogos (NHEJ), que no necesita de un ADN donante o un ssODN, y suele provocar pequeñas inserciones y eliminaciones (indels). (Kim & Kim, 2014)

4.1.2 Inversiones y translocaciones

Otra de las mutaciones que se pueden generar con la técnica CRISPR/Cas9 son las inversiones. Éstas se generan al producirse dos DSBs en el mismo cromosoma, y, posteriormente, se invierte el fragmento generado o se produce una larga eliminación al reparar los cortes mediante NHEJ.

Por otro lado, tenemos las translocaciones cromosómicas. Esta modificación, a diferencia de las inversiones, usa dos sgRNAs que generan DSB en dos loci de cromosomas no homólogos, seguidos de la reparación por NHEJ, un proceso que puede darse *in vivo* (Figura 12). Esta técnica es útil a la hora de estudiar ciertos tipos de cánceres.

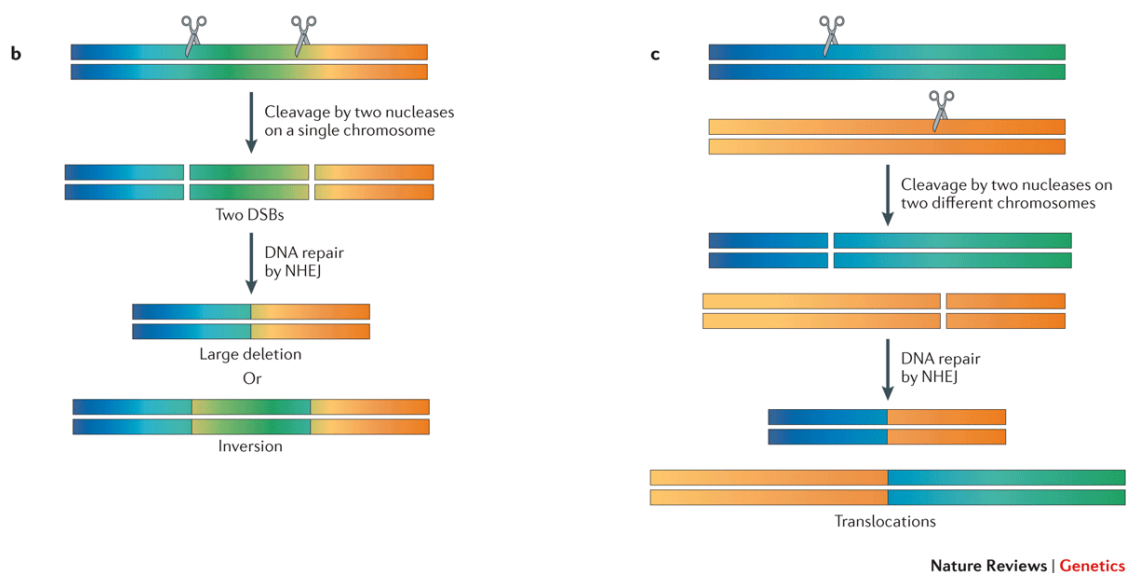


Figura 12. Proceso de inversión y translocación cromosómica. Cuando se generan dos DSB en cis en un solo cromosoma (b) da como resultado una larga región eliminada o una inversión. Cuando se generan dos DSB en dos cromosomas diferentes (c), se producen las translocaciones. (Kim & Kim, 2014)

4.2 Terapia génica

La terapia génica es muy atractiva, ya que tiene potencial para reparar permanentemente la secuencia que causa la enfermedad, evitando así la necesidad de tratamientos adicionales. En el último par de décadas se ha estado estudiando el uso de nucleasas programables para llevar a cabo las modificaciones del locus de interés, solucionando así el problema.

CRISPR/Cas9 tiene una gran capacidad para tratar trastornos genéticos. Esto es debido a que el apareamiento de bases entre sgRNA y el ADN objetivo le confiere especificidad. Esto hace que sea un complejo fácil de usar y personalizable, lo cual lo hace realmente atractivo para su uso en terapia génica.

Las enfermedades más adecuadas para la edición con CRISPR/Cas9 son aquellas monogénicas (Giono, 2017), que requieren apuntar a un solo alelo, ya que la

eficiencia bialélica es mucho menor. Las enfermedades que involucran múltiples mutaciones son más complejas de tratar con CRISPR/Cas9, pero se cree que en un futuro podría permitir la focalización simultánea debido a su capacidad para editar múltiples sitios en el genoma (multiplexación). Hoy en día ya hay algunas enfermedades que pueden tratarse con CRISPR/Cas9, las cuales vemos reflejadas en la Tabla 2.

Por otro lado, se ha visto que, para las enfermedades causadas por productos genéticos patógenos, CRISPR/Cas9 puede alterar el alelo dominante mediante NHEJ. Si la enfermedad es causada por la pérdida de función de un gen, este puede corregirse usando HDR, con una copia funcional del gen proporcionada en una plantilla (donante) (Ran et al., 2013).

Disease	Mutation target	Delivery method	Target cells	Correction efficiency	References
β -Thalassaemia	Deletion in <i>HBB</i>	Electroporation	Human iPSCs	17.6%	Xie et al. (2014b)
		Intracytoplasmic injection	Human tripronuclear zygotes	14.3%	Liang et al. (2015)
Cystic fibrosis	Deletion in <i>CFTR</i>	Lipofection	Human intestinal organoids	Unknown-edited cells were selected	Schwank et al. (2013)
Hereditary tyrosinemia	Point mutation in <i>FAH</i>	Hydrodynamic injection	<i>in vivo</i> mice hepatocytes	$0.40 \pm 0.12\%$	Yin et al. (2014)
HIV-1	CCR5 Δ 32	Electroporation	Human iPSCs	100%	Zhu et al. (2015)
	Inactivation of proviral DNA	Nucleofection	JLat10.6 cells	30%	Ye et al. (2014)
Duchenne muscular dystrophy	Exon deletion in dystrophin gene	Electroporation	Human iPSCs	50%	Li et al. (2015)
α 1-Antitrypsin deficiency	Point mutation in <i>SERPINA1</i>	Electroporation	Human iPSCs	18.8%	Smith et al. (2014a)
Polycythaemia vera	Point mutation in <i>JAK2</i>	Electroporation	Human iPSCs	9.15%	Smith et al. (2014a)
Cataracts	Deletion in <i>Crygc</i>	Electroporation	Mouse spermatogonial stem cells	29.7%	Wu et al. (2014)
Epstein-Barr virus	Inactivation of viral promoter	Electroporation	Human epithelial cell lines	94.2%	Yuen et al. (2015)
LDL-C	Disruption of <i>Pcsk9</i>	Adenovirus	<i>in vivo</i> mice hepatocytes	50%	Ran et al. (2015)
		Adeno-associated virus		40%	Ding et al. (2014)

Tabla 2. Enfermedades genéticas que se han corregido con éxito en células mediante tecnología CRISPR-Cas9. (Eloise J. Lockyer, 2016)

4.3 VIH

En 2015, Weijun Zhu y varios compañeros llevaron a cabo un estudio donde se investigó la eficacia de CRISPR/Cas9 para inactivar el ADN del VIH-1 latente en células infectadas. En este estudio se probaron 10 sitios en el ADN del VIH-1 como blancos potenciales para CRISPR/Cas9. Se observó que el sistema CRISPR/Cas9 mutó eficientemente todos los sitios objetivo, siendo en el décimo sitio donde se mostró la mayor tasa de mutación. A este sitio se le denominó T10, y se encuentra concretamente en el segundo exón de Rev. Esto redujo la producción viral en un 20%. Estos resultados sugirieron que CRISPR/Cas9 podría ser una estrategia prometedora para inactivar el ADN proviral del VIH-1 latente (que se ha introducido, pero no está activo).

El sistema CRISPR/Cas9 elimina los reservorios de VIH-1 en estado latente y puede dirigirse tanto al ADN del VIH-1 inactivo como al activo con una eficiencia similar. Cuando el equipo de Zhu identificó el sitio específico, T10, estaban buscando una proteína viral de VIH-1 que tuviera un papel crucial en la regulación de la expresión génica y la replicación del virus, en este caso Rev.

La eficacia de CRISPR/Cas9 en la inactivación del ADN de VIH-1 latente se evaluó mediante la introducción del sistema en células JLat10.6 (infectadas latentes con VIH-1). Los resultados observados respaldaron la hipótesis principal de la capacidad de mutación del ADN proviral que tiene CRISPR/Cas9 (Zhu et al., 2015).

5. Inconvenientes del sistema CRISPR/Cas9: efectos Off target

Aunque el sistema CRISPR/Cas9 es una herramienta muy útil para la edición de genomas debido a su bajo coste y su facilidad de uso, también presenta inconvenientes. El principal inconveniente es la generación de mutaciones *off target*, es decir, en sitios fuera del objetivo previsto. Estos efectos ocurren porque en su origen (bacterias), el sistema está diseñado como un sistema inmune adaptativo, para reconocer y destruir ADN viral variable. Sin embargo, esta flexibilidad de reconocimiento de secuencias puede dar lugar a mutaciones no deseadas cuando se usa en la modificación genómica (Ma et al., 2014).

Estos efectos pueden ser dependientes del sgRNA, con Cas9 tolerando hasta 3 desalineaciones entre sgRNA y el ADN genómico, pero también pueden ocurrir de manera independiente del sgRNA.

Para evaluar los efectos off-target en CRISPR/Cas9, se compararon tres variantes de Cas9 (eSpCas9, SpCas9-HF1, hypaCas9) para estimar la actividad en sitios objetivo y off-target. Métodos como GUIDE-seq¹ se utilizaron para mostrar la reducción en el número de sitios fuera de objetivo con las variantes de Cas9 de alta fidelidad, como eSpCas9, SpCas9-HF1 y hypaCas9. Estos enfoques permitieron identificar que, por ejemplo, de los 134 sitios fuera de objetivo de un sgRNA dirigido a VEGFA (factor de crecimiento endotelial vascular A) con SpCas9, solo 19, 24 y 18 de esos sitios fuera de objetivo también fueron detectables con eSpCas9, SpCas9-HF1 y hypaCas9, respectivamente.

Como posible solución a este problema, se desarrollaron otros métodos como alternativa a GUIDE-seq, métodos como Digenome-seq², BLESS³ y BLISS⁴, para identificar y caracterizar los efectos fuera del objetivo (off targets) con alta sensibilidad y precisión en la edición genómica con CRISPR/Cas9. Éstos complementaban las

¹ GUIDE-Seq (Genome-wide, Unbiased Identification of DSBs Enabled by Sequencing) es un método que identifica con precisión las rupturas de doble cadena (DSB) del ADN causadas por nucleasas como CRISPR/Cas9. Insertando un oligonucleótido en los sitios de ruptura y luego secuenciándolos, permite mapear cortes en sitios objetivo y fuera de objetivo (off-target). Este método es altamente sensible y preciso, esencial para detectar cortes no deseados y mejorar la seguridad en la edición genómica.

² Digenome-seq es un método que consiste en la digestión de ADN purificado con complejos Cas9/ARNg, seguido de la secuenciación del genoma completo. Este enfoque es muy sensible para identificar sitios fuera del objetivo, aunque puede resultar costoso y requiere una cobertura de secuenciación alta, así como un genoma de referencia para comparar los datos obtenidos.

³ BLESS marca las roturas de doble cadena (DSBs) en el genoma y luego secuencia estas regiones. Este método es útil para capturar perfiles de DSBs y detectar modificaciones fuera del objetivo, pero puede ser costoso y tiene dificultades para detectar grandes deleciones, deleciones cromosómicas y translocaciones.

⁴ BLISS también marca in situ las roturas de ADN y las secuencias. Aunque es eficaz para identificar sitios fuera del objetivo, puede ser costoso y requiere una validación cuidadosa mediante secuenciación dirigida para asegurar la precisión de los resultados.

técnicas ya existentes y mejoraban la capacidad de detección de sitios fuera de objetivo.

Discusión

CRISPR/Cas, aunque originalmente es un sistema de defensa bacteriana contra infecciones virales, se ha convertido en una de las técnicas más importantes en ingeniería genética para la edición de genomas, debido a su simplicidad y bajo costo. Ha superado a otros métodos como las nucleasas de dedos de zinc (ZFN) y las nucleasas efectoras de tipo activador de transcripción (TALEN) gracias a su mayor eficacia. Además, la proteína Cas9 del sistema CRISPR/Cas puede ser modificada, lo que permite crear nuevas aplicaciones y proteínas alternativas. Esto ha llevado a que la mayoría de los investigadores en edición genómica dirijan sus esfuerzos a utilizar este sistema. El uso excesivo de CRISPR/Cas ha revelado algunos inconvenientes, como los cortes off-target, que limitan su uso. A pesar de estos desafíos, la comunidad científica tiene grandes esperanzas en los avances y descubrimientos que esta técnica puede generar.

Los beneficios que la tecnología CRISPR/Cas ha aportado en sectores como el sanitario y agrícola, entre otros, son innegables. Aunque actualmente, una de las principales líneas de investigación en CRISPR/Cas se centra en reducir los efectos fuera del objetivo (Guo et al., 2023).

6. Conclusión y perspectiva de futuro

Han pasado más de 40 años desde que un equipo japonés, durante sus estudios sobre el funcionamiento de una enzima, descubriera por casualidad lo que hoy conocemos como CRISPR/Cas. Esta técnica se ha convertido en una poderosa herramienta que ha revolucionado el mundo de la genética. En poco tiempo, CRISPR/Cas se ha posicionado a la vanguardia de la ingeniería genética debido a su sencillez, eficacia y bajo costo.

Pese a sus inconvenientes, esta técnica tiene cada día más aplicaciones, desde la mejora genética en la producción animal y vegetal hasta la terapia génica y el tratamiento de enfermedades como el VIH. Su amplio espectro de aplicaciones la convierte en una esperanza para tratar enfermedades que antes parecían incurables. Sin embargo, el uso de CRISPR/Cas9 también plantea importantes limitaciones

éticas, como las preocupaciones sobre la modificación de la línea germinal, el potencial de desigualdad en el acceso a tratamientos y los posibles efectos a largo plazo que aún no se comprenden completamente.

Es importante destacar el papel fundamental de la investigación. CRISPR/Cas se ha convertido en la mejor herramienta para la edición dirigida del genoma gracias a la labor constante de los investigadores, cuyo trabajo nos ha permitido alcanzar el conocimiento actual. Debemos seguir trabajando para superar las restricciones y desafíos, y alcanzar nuevos objetivos. A pesar de los desafíos, CRISPR/Cas es la herramienta más prometedora para la edición genómica dirigida.

7. Bibliografía

- Adhikari, P., & Poudel, M. (2020). CRISPR-Cas9 in agriculture: Approaches, applications, future perspectives, and associated challenges. *Malaysian Journal of Halal Research*, 3(1), 6–16. <https://doi.org/10.2478/mjhr-2020-0002>
- Barrangou, R., & Marraffini, L. A. (2014). CRISPR-cas systems: Prokaryotes upgrade to adaptive immunity. In *Molecular Cell* (Vol. 54, Issue 2, pp. 234–244). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.03.011>
- Bhatia, S., Pooja, & Yadav, S. K. (2023). CRISPR-Cas for genome editing: Classification, mechanism, designing and applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 238, 124054. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.124054>
- Boch, J., Scholze, H., Schornack, S., Landgraf, A., Hahn, S., Kay, S., Lahaye, T., Nickstadt, A., & Bonas, U. (2009). Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science (New York, N.Y.)*, 326(5959), 1509–1512. <https://doi.org/10.1126/science.1178811>
- Butt, H., Eid, A., Ali, Z., Atia, M. A. M., Mokhtar, M. M., Hassan, N., Lee, C. M., Bao, G., & Mahfouz, M. M. (2017). Efficient CRISPR/Cas9-Mediated Genome Editing Using a Chimeric Single-Guide RNA Molecule. *Frontiers in Plant Science*, 8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01441>
- Chylinski, K., Makarova, K. S., Charpentier, E., & Koonin, E. V. (2014). Classification and evolution of type II CRISPR-Cas systems. *Nucleic Acids Research*, 42(10), 6091–6105. <https://doi.org/10.1093/nar/gku241>
- Dow, L. E. (2015). Modeling Disease In Vivo With CRISPR/Cas9. *Trends in Molecular Medicine*, 21(10), 609–621. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2015.07.006>
- Eloise J. Lockyer. (2016). The potential of CRISPR-Cas9 for treating genetic disorders. *Bioscience Horizons: The International Journal of Student Research*, 9. <https://doi.org/10.1093/biohorizons/hzw012>
- Giono, L. E. (2017). *CRISPR/CAS9 Y LA TERAPIA GÉNICA*. 77, 405–409. www.medicinabuenosaires.com

- Guo, C., Ma, X., Gao, F., & Guo, Y. (2023). Off-target effects in CRISPR/Cas9 gene editing. In *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* (Vol. 11). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2023.1143157>
- Hryhorowicz, M., Lipiński, D., Zeyland, J., & Słomski, R. (2017). CRISPR/Cas9 Immune System as a Tool for Genome Engineering. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 65(3), 233–240. <https://doi.org/10.1007/s00005-016-0427-5>
- Ishino, Y., Shinagawa, H., Makino, K., Amemura, M., & Nakata, A. (1987). Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *Journal of Bacteriology*, 169(12), 5429–5433.
- Jansen, R., Embden, J. D., Gastra, W., & Schouls, L. M. (2002). Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Molecular Microbiology*, 43(6), 1565–1575.
- Kim, H., & Kim, J.-S. (2014). A guide to genome engineering with programmable nucleases. *Nature Reviews Genetics*, 15(5), 321–334. <https://doi.org/10.1038/nrg3686>
- Lammoglia-Cobo MF, Lozano-Reyes R, & García-Sandoval CD. (2016). La revolución en ingeniería genética: sistema CRISPR/Cas. *Investigación En Discapacidad*, 5, 116–128.
- Ma, Y., Zhang, L., & Huang, X. (2014). Genome modification by <sc>CRISPR</sc> /Cas9. *The FEBS Journal*, 281(23), 5186–5193. <https://doi.org/10.1111/febs.13110>
- Nishimasu, H., Ran, F. A., Hsu, P. D., Konermann, S., Shehata, S. I., Dohmae, N., Ishitani, R., Zhang, F., & Nureki, O. (2014). Crystal Structure of Cas9 in Complex with Guide RNA and Target DNA. *Cell*, 156(5), 935–949. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.02.001>
- Ran, F. A., Hsu, P. D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D. A., & Zhang, F. (2013). Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature Protocols*, 8(11), 2281–2308. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.143>

Torres-Ruiz, R., & Rodriguez-Perales, S. (2017). CRISPR-Cas9 technology: applications and human disease modelling. *Briefings in Functional Genomics*, 16(1), 4–12. <https://doi.org/10.1093/bfpg/elw025>

Zhu, W., Lei, R., Le Duff, Y., Li, J., Guo, F., Wainberg, M. A., & Liang, C. (2015). The CRISPR/Cas9 system inactivates latent HIV-1 proviral DNA. *Retrovirology*, 12(1), 22. <https://doi.org/10.1186/s12977-015-0150-z>