

CRISPR-Cas9 y ... ¿Bebés a la carta?

Ángel Martín Bastida

Resumen— Recientemente, las científicas Jennifer Doudna y Emmanuelle Charpentier han desarrollado un sistema capaz de reescribir el genoma con un nivel de precisión sin precedentes, y de una forma relativamente sencilla y económica. Dicho sistema, llamado CRISPR-Cas9, supone una revolución total para el ser humano. La tecnología CRISPR-Cas9 es potencialmente capaz de realizar modificaciones a la carta en el genoma de células somáticas, germinales o embrionarias. Las primeras aproximaciones de la técnica se desarrollaron con idea de evitar enfermedades genéticas. Sin embargo, la realidad es que, al menos a efectos teóricos, CRISPR-Cas9 nos permitiría ir mucho más allá. El peligro potencial frente a un posible uso inapropiado de esta potente herramienta ha obligado a la comunidad científica a reconsiderar sus implicaciones éticas y de seguridad. No obstante y a pesar de la pausa, ya es posible afirmar: la era de los humanos de diseño ha llegado.

Palabras Claves— CRISPR-Cas9, Genome-editing, Líneas germinales, ARTs, Bioética.



1. INTRODUCCIÓN

Los CRISPRs (del inglés: “*Clustered regularly interspaced short palindromic repeats*”) son agrupaciones de pequeñas secuencias palindrómicas de ADN que se repiten y están separadas por ADN espaciador. Se asocian a un grupo de genes (genes Cas) y a una secuencia líder para conformar un complejo sistema de inmunidad adaptativa en organismos procariotas. [1] Los productos de transcripción de dichos espaciadores guían la degradación de ADN exógeno codificante para transcritos homólogos a ellos, llevándose a cabo un proceso de silenciamiento génico a nivel de ADN. [1] [2]

Cuando se comenzó a estudiar el mecanismo, se tomó un sistema sencillo CRISPR/Cas, basado en una única proteína: la nucleasa Cas9. El sistema CRISPR-Cas9, concretamente, está inspirado en el sistema inmune adaptativo de *Streptococcus pyogenes* SF370. Cuando la célula reconoce material genético exógeno, transcribe una molécula de RNA de gran tamaño formada por las secuencias palindrómicas y los espaciadores. Dicha molécula es procesada para dar lugar a complejos efectores formados por una molécula de crRNA (productos transcripcionales de los espaciadores) y por Cas9. Estos complejos también están formados por una molécula de RNA llamada tracrRNA (“*Trans-activating crRNA*”), implicada en la maduración del crRNA. La molécula de crRNA guía a Cas9 hasta la molécula de ADN diana, llevándose a cabo la degradación. [3]

Cuando se combinaron el espaciador y el tracrRNA, se descubrió que junto con Cas9 eran capaces de encontrar el

ADN diana correcto y cortarlo. A la unión entre el espaciador y el tracrRNA se le llamó “RNA guía”. Así, introduciendo un gen exógeno acompañado de su RNA guía, se descubrió que era posible suprimir un gen endógeno o corregir una mutación determinada de forma específica, por acción de Cas9. [3] Esto es posible porque al introducir en el interior celular el RNA-guía con el gen exógeno diana, se produce una rotura específica de la doble cadena (DSB) gracias a que la Cas9 tiene dos sitios de corte, uno para cada hebra de ADN. Las DSBs son reparadas por recombinación homóloga (HDR) en presencia del DNA exógeno. Por esto, cuando se produce una recombinación del tipo HDR se puede introducir el gen exógeno de interés o corregir una mutación determinada con un alto nivel de especificidad.

A lo largo de los años, la todavía inexistente posibilidad de modificar genéticamente las células de las líneas germinales ha sido generalmente rechazada, por ir en contra de las leyes de la naturaleza, entre otros motivos. [4] Sin embargo, en algunos países existen vacíos legales que dotan de cierta maniobrabilidad al uso de nuevas herramientas de edición genómica, puesto que o bien las normas están dictadas por directrices en lugar de por leyes, o bien las leyes están referidas a técnicas de ingeniería genética convencionales y no afectan a las técnicas modernas. Reino Unido, el país con mayor impacto a nivel mundial en el ámbito de la reproducción asistida, ha aprobado recientemente un proyecto de ley que permitiría la donación mitocondrial para prevenir la aparición de enfermedades mitocondriales en la descendencia. Y esto supondría, básicamente, la modificación genética de las líneas germinales. [5]

Ante la inminente posibilidad de que CRISPR-Cas9 se convierta en una herramienta clínicamente viable para la edición de genomas en líneas germinales, será necesario sentar unos límites legales de una forma extremadamente prudente. Para la valoración de tal necesidad, a continuación se explorarán los procedimientos de modificación, los objetivos y la relación beneficio-riesgo del sistema CRISPR-Cas9 para la edición del genoma en líneas germinales.

2. EDICIÓN GENÓMICA EN LÍNEAS GERMINALES

La edición genómica se puede realizar a nivel de embrión, de ovocito o de espermatogonias (Figura 1) [6].

2.1. Embriones

Se realizaría por microinyección del complejo efector de la edición (RNA-guía, DNA exógeno y nucleasas) en el cigoto (estadio unicelular del embrión). Posteriormente, se llevaría a cabo el análisis de las modificaciones on-target y off-target mediante diagnóstico genético preimplantacional (PGD), en una biopsia de blastómera (si se va a transferir el embrión fresco) o trofoectodermo (si se va a transferir el embrión congelado). Tras comprobar que las modificaciones se hayan llevado a cabo correctamente, se procedería a la transferencia embrionaria.

2.2. Ovocitos

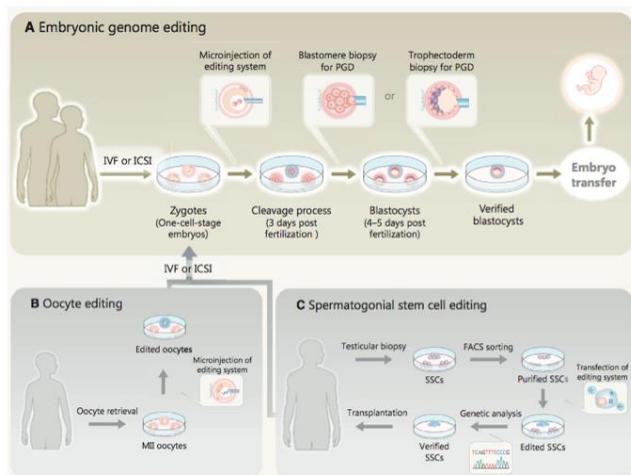


Fig. 1. Genome-editing en la línea germinal [6]

La edición genómica a nivel de ovocitos tendría lugar en el estadio de ovocito secundario, cuando éste se encuentra detenido en metafase II. El ovocito editado puede ser fertilizado por un espermatozoide mediante IVF o ICSI, y el embrión resultante sería implantado en el útero materno.

2.3. Espermatogonias

Las células madres espermatogonias se extraerían mediante una biopsia testicular, se procedería a su separación, purificación y edición con CRISPR-Cas9. Tras la verificación por PGD, se incorporarían de nuevo al hombre para que terminen de madurar in vivo. Posteriormente, se seleccionarían las células editadas para su fertilización por IVF o ICSI.

3. CONSIDERACIONES

El primer aspecto a considerar es que la modificación embrionaria podría tener efectos contraproducentes (y lo que es más importante, insospechados) en el individuo formado. Sin haberse documentado demasiado, uno podría sospechar las terribles consecuencias que tendría un corte off-target (aquellos que tienen lugar fuera de la diana) en un gen supresor de tumores, como TP53. En efecto; de ser así, el individuo desarrollará cáncer probablemente poco después del nacimiento.

En este punto cabe preguntarse.. ¿por debajo de qué porcentaje de error podríamos considerar “específica” una modificación? ¿cómo sería posible evaluar las modificaciones off-target? En cuanto a la posibilidad de modificar fenotipos controlados por más de un locus, la introducción de varios RNA-guía multiplicaría las probabilidades de ocurrencias off-target, acumulándose alteraciones por falta de especificidad.

El uso de enzimas más sofisticadas y el desarrollo de herramientas de análisis del perfil genómico de sitios off-target de alta ocurrencia, permitirán reducir la incidencia de dichos efectos. [7] Sin embargo, la vida nunca será una ciencia exacta, y por tanto la probabilidad de ocurrencia nunca será cero. En este punto, será preciso valorar si compensa asumir un riesgo, especialmente en aquellas situaciones en las que el embrión sabemos lleva escrito en su genoma el alelo que le provocará una determinada enfermedad. Todo será cuestión de probabilidades.

La corrección de pequeñas mutaciones en el embrión para revertir el genotipo silvestre en presencia de una alteración que provoca una enfermedad, se vislumbra como la primera aplicación del sistema CRISPR-Cas9. En contra de objeciones éticas, el rescate del genotipo en este tipo de casos podría considerarse como una recuperación de su estado normal. No obstante, otra corriente de pensamiento podía considerarlos como una transgresión del orden natural de los acontecimientos. En cualquiera de los casos, queda claro que por el momento las modifica-

ciones que deben estudiarse son aquellas en las que se revierta el genotipo silvestre vía HDR, utilizando un molde de ADN exógeno de pequeña longitud, con un solo tipo de RNA-guía, y con la finalidad única de corregir un fenotipo que comprometa seriamente la salud del individuo a desarrollarse.

4. OBJETIVOS

Al ámbito clínico de aplicación de CRISPR-Cas9 se le podría sumar una aplicación adicional relacionada directamente con el ámbito social: la mejora genética de los seres humanos. Además, se podría considerar su uso para la optimización y personalización de las técnicas de reproducción asistida (ART).

4.1. Mejora genética humana

Un estudio reciente ha demostrado que aproximadamente la mitad de las mujeres que buscan un donante de esperma consideran la inteligencia igual de importante que la salud, mientras que un grupo más pequeño (40,7%) da más importancia a los rasgos étnicos del individuo. Aunque se han descrito varios SNPs relacionados con la atención y la capacidad de aprendizaje del individuo, los efectos de éstos son muy pequeños. En este sentido, por ahora sería difícil aumentar la inteligencia de un individuo por edición genómica. En cuanto a los rasgos étnicos, un reciente estudio ha demostrado que en cigotos de rata el tratamiento con CRISPR-Cas9 permite rescatar a los individuos albinos por modificación de un SNP. Es de suponer que en este punto alguien se pregunte si es posible elegir tener un niño rubio de ojos azules. Pues bien, se sabe que una variante del gen OCA2 (rs1667394 A) está relacionada con el pelo rubio y los ojos azules. Sin embargo, la modificación de este gen no tendrá los efectos deseados porque el color de ojos está controlado por al menos 16 genes. [8] Por tanto, podemos afirmar que conocemos el procedimiento y la técnica, pero que aun desconocemos la correspondencia genotípica de muchos rasgos fenotípicos. Una vez sea conocida dicha relación (simplemente cuestión de tiempo), tendrán que evaluarse las posibles consecuencias de estos cambios a nivel sistémico, con el objetivo de aceptar o rechazar la viabilidad de esa modificación en concreto.

4.2. Personalización de las ART

La edición de embriones y células germinales permitiría incrementar la eficiencia de los tratamientos de reproducción asistida (ARTs), ya que en algunos casos la infertilidad está asociada con condiciones genéticas desfavorables

en los propios pacientes. Es el caso de las reorganizaciones cromosómicas, siendo la más común las translocaciones recíprocas (1 de cada 500 individuos). Este fenómeno consiste en el intercambio balanceado de material genético entre dos regiones cromosómicas terminales, y suele derivar en pérdidas recurrentes del embarazo y nacimiento de individuos con anomalías congénitas. Un paciente que no considerara la donación de gametos o la adopción, podría encontrar una solución en CRISPR-Cas9 para generar descendencia “a su imagen y semejanza”. [9]

4.3. Eugenesia

Quizá sea éste sea el aspecto que suscita mayor precaución. La apertura a la modificación de la línea germinal es, simplemente, una apertura sin retorno a la eugenesia: la selección positiva de las versiones “buenas” del genoma humano y la eliminación de las “malas” versiones, no solo para la salud del individuo, sino también para el futuro de la especie. En cualquier caso, eugenesia racional seguirá siendo eugenesia, y nada podría eliminar el dolor de aquellos que nazcan en el mundo de la modificación de la línea germinal si nadie invirtió demasiado en sus gametos. A estas personas les tocará vivir con la complejidad de un genoma diferente de lo que esta tecnología será capaz de definir como “normal”.

5. CONCLUSIONES

Es posible imaginar el día en el que los cromosomas humanos puedan ser modificados para asegurar que una característica u otra esté presente en un niño nacido. Este día está relativamente cerca, y nos encontramos andando a pasos de gigante. Por este motivo, los desarrolladores del sistema han solicitado la convocatoria de un grupo mundial de expertos en la tecnología de la ingeniería del genoma, el derecho y la bioética, así como de otros miembros de la comunidad científica, agencias gubernamentales y otros grupos de interés, con el fin de examinar más a fondo la seguridad de la técnica y el alcance que su aplicación debe tener por el momento.

La edición de genomas en líneas germinales permitirá prevenir enfermedades monogénicas y aumentará la eficacia de los tratamientos de reproducción asistida. La modificación genética humana deberá ser tomada con extrema cautela, y en cualquier caso, será crucial que la sociedad conozca los pros y contras de las prácticas en el posible caso de que éstas lleguen a ser aprobadas. Para esto, la comunidad científica debe analizar rigurosamente los problemas de seguridad de su empleo, estableciéndolo

se unas medidas reguladoras prudentes, y siempre anteponiendo el sentido común a la enorme diversidad de creencias culturales que nos gobiernan. Cualquier acción deberá realizarse bajo un extremo nivel de sensatez, y especialmente bajo la sola premisa de mejorar la calidad de vida de los seres humanos sin llegar en ningún caso a comprometerla.

REFERENCIAS

- [1] Horvath, P., & Barrangou, R. (2010). CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. *Science* (New York, N.Y.), 327(5962), 167–70. doi:10.1126/science.1179555
- [2] Marraffini, L. A., & Sontheimer, E. J. (2010). CRISPR interference: RNA-directed adaptive immunity in bacteria and archaea. *Nature Reviews. Genetics*, 11(3), 181–90. doi:10.1038/nrg2749
- [3] Mali, P., Esvelt, K. M., & Church, G. M. (2013). Cas9 as a versatile tool for engineering biology. *Nature Methods*, 10(10), 957–63. doi:10.1038/nmeth.2649
- [4] Wilson, J. (2013). Embracing complexity: theory, cases and the future of bioethics. *Monash Bioethics Review*, 32(1-2), 3–21.
- [5] Araki, M., & Ishii, T. (2014). International regulatory landscape and integration of corrective genome editing into in vitro fertilization. *Reproductive Biology and Endocrinology: RB&E*, 12, 108. doi:10.1186/1477-7827-12-108
- [6] Ishii, T. (2015). Germ line genome editing in clinics: the approaches, objectives and global society. *Briefings in Functional Genomics*. doi:10.1093/bfgp/elv053
- [7] Lander, E. S. (2015). Brave New Genome. *The New England Journal of Medicine*, 373(1), 5–8. doi:10.1056/NEJMp1506446
- [8] Sawyer, N., Blyth, E., Kramer, W., & Frith, L. (2013). A survey of 1700 women who formed their families using donor spermatozoa. *Reproductive Biomedicine Online*, 27(4), 436–47. doi:10.1016/j.rbmo.2013.07.009
- [9] El-Toukhy, T., & Braude, P. (Eds.). (2014). *Preimplantation Genetic Diagnosis in Clinical Practice*. London: Springer London. doi:10.1007/978-1-4471-2948-6



Ángel Martín Bastida es estudiante de cuarto curso del Grado en Biotecnología, en la Universidad Pablo de Olavide de Sevilla.

El sistema inmune y el sexo

Blanca de Alarcón Gómez, Rocío Espinosa Portero

Resumen— El sistema inmunológico funciona de forma diferente en hombres y en mujeres dando lugar a un dimorfismo sexual. Esto hace que la respuesta inmune sea distinta, por lo que el ataque de patógenos, así como las enfermedades autoinmunes, no afectan de igual forma. Una posible causa de esta diferencia es que las mujeres están preparadas para el embarazo, un evento que incluye la presencia de otro organismo inmunológicamente diferente a ellas.

Palabras Claves— Embarazo, Hormonas, Respuesta inmune, Sistema inmune, Sexo

1. INTRODUCCIÓN

En vista a las muchas diferencias que hay entre hombres y mujeres a nivel biológico, no debería sorprendernos que el sexo también influya en el desarrollo de la respuesta inmune. Sin embargo, debido a la enorme complejidad del sistema inmune, aún a día de hoy, tras años de estudio, se desconocen aspectos que tienen relación con esta parte tan importante de nuestro organismo. Un ejemplo de esto es el reciente descubrimiento de la in-

fluencia de las hormonas sexuales en la respuesta inmune humana, hecho que implica un dimorfismo entre ambos sexos. Como veremos a continuación, el sistema inmune es diferente según el género, y esto además tiene una causa: el embarazo como evento inmunológico; y una consecuencia: las enfermedades autoinmunes y su distinta incidencia en hombres y mujeres.