

Impacto y oportunidad de CRISPR-Cas9 en Cardiología

Impact and opportunity of CRISPR-Cas9 in Cardiology

David Vetcher

RESUMEN

Cada década aparece una nueva y fundamental tecnología genética que viene a cambiarlo todo, revolucionando el desarrollo de la biología molecular.

En esta década, el gran avance biotecnológico es la nueva y poderosa tecnología de edición de genes CRISPR-Cas9, el mayor hito de la biología desde el PCR, inaugurando una nueva era de ingeniería genética en la que se puede modificar la secuencia del ADN en el genoma (genome editing) de cualquier célula eucariota, especialmente humana, de una manera fácil, rápida, barata y, sobre todo, de alta precisión.

La aplicación de CRISPR-Cas9 tiene mucho que ofrecer en el tratamiento de desórdenes cardiovasculares, abriendo las puertas a la adopción de los nuevos conocimientos.

Palabras claves: biología molecular, genética cardiovascular, tecnología de edición de genes, sistema CRISPR-Cas9.

ABSTRACT

Every decade a new and fundamental genetic technology arises to change everything, revolutionizing the development of molecular biology. In this decade, this big biotechnology breakthrough is the new and powerful CRISPR-Cas9 Gene Editing Technology, the biggest milestone in biology since the Polymerase Chain Reaction (PCR). CRISPR-Cas9 has started a new era of genetic engineering in which you can modify the DNA sequence in the genome (genome editing) of any eukaryotic cell, especially human, in an easy, fast, cheap and, above all, high precision way. The application of CRISPR-Cas9 has much to offer in the treatment of cardiovascular disorders, opening the doors to the adoption of new knowledge.

Key words: molecular biology, cardiovascular genetic, gene editing technology, CRISPR-Cas9 system.

Revista Argentina de Cardioangiología Intervencionista 2017;8(2):62-66

INTRODUCCIÓN

Cada década aparece una nueva y fundamental tecnología genética que viene a cambiarlo todo, revolucionando el desarrollo de la biología molecular, empujando hacia adelante el estudio del genoma a niveles que hasta entonces parecían imposibles, haciendo más fácil, rápida y precisa la manipulación del genoma.

En los 70 fueron las enzimas de restricción, las herramientas del ADN recombinante, que pueden reconocer una secuencia característica de nucleótidos dentro de una molécula de ADN y cortarlo en ese punto específico, lo cual hace factible el aislamiento de fragmentos definidos de ADN. Esto marcó el comienzo de una nueva era en la biotecnología, al permitir alcanzar la habilidad de manipular las moléculas de ADN haciendo posible el estudio de genes. El Premio Nobel de Medicina de 1978 fue concedido a los microbiólogos W. Arber, D. Nathans y H. Smith por el

descubrimiento de las endonucleasas de restricción, lo que condujo al desarrollo de la tecnología de ADN recombinante.

En los 80, la **reacción en cadena de la polimerasa**, conocida como **PCR** por sus siglas en inglés (*polymerase chain reaction*), una técnica de biología molecular desarrollada en 1985 por K. Mullis que le valió el premio Nobel de Química. Es un método de amplificación de genes que permite obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN particular, partiendo de un mínimo. Tras la amplificación resulta mucho más fácil identificar, con muy alta probabilidad, virus o bacterias causantes de una enfermedad, es de suma utilidad en la clonación de genes y en identificar personas en la medicina forense. Estos usos derivados de la amplificación han hecho que se convierta en una técnica muy extendida, sobre todo en el ámbito de la investigación.

En los 90, una *next-generation* o secuenciación de alto rendimiento del ADN ha acelerado significativamente la investigación y los descubrimientos en biología. Las técnicas actuales permiten realizar esta secuenciación a gran velocidad, lo cual ha sido de gran importancia para proyectos a gran escala como el Proyecto Genoma Humano. El premio Nobel de Química de 1980 fue otorgado a Frederick Sanger, compartido con Walter Gilbert, por el desarrollo del método de secuenciación del ADN.

1. Expresidente del Colegio Argentino de Cardioangiólogos Intervencionistas (CACI).

✉ Correspondencia: davidvetcher@gmail.com

Los autores no declaran conflictos de intereses

Recibido: 20/02/2017 | Aceptado: 16/05/2017

En esta década, el gran avance biotecnológico es la nueva y poderosa **tecnología de edición de genes CRISPR-Cas9**, el mayor hito de la biología desde la PCR, inaugurando una nueva era de ingeniería genética en la que se puede editar, corregir, alterar, borrar, insertar, modificar la secuencias del ADN en el genoma (*genome editing*) de cualquier célula eucariota, especialmente humana, de una manera fácil, rápida, barata y sobre todo, de alta precisión.

CONCEPTOS BÁSICOS E HISTORIA

La plataforma tecnológica de ingeniería genómica basada en CRISPR asociado a Cas9 es una herramienta molecular, rápida y ampliamente adoptada, para editar o corregir el genoma, modular directamente la función de las secuencia de ADN o insertar nuevos transgenes. La historia de CRISPR, de cómo un misterioso sistema de defensa antiviral encontrado en la diversidad de bacterias y archaeas terminó siendo una de las más poderosas y versátiles plataformas de ingeniería biológica, comienza en 1987 y tomó más de una década de investigación básica para entender la función biológica de esa repetición de elementos ahora conocida como CRISPR. El término CRISPR, acrónimo de *clustered regularly interspaced short palindromic repeats*, en español repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas, fue acuñado por Jansen y el español Francisco Mojica.

Las bacterias y archaeas usan el fenómeno o actividad del sistema CRISPR-Cas como un mecanismo estratégico natural de defensa y memoria contra las infecciones virales. Este sistema inmune adaptativo, microbiano, antiviral, cuya función es la protección, destruye la invasión viral.

Más adelante, en un famoso artículo de 2013 publicado en la revista *Science*, Jennifer Doudna (en la Universidad de California en Berkeley) y Emmanuelle Charpentier (en la Universidad de Umea) tuvieron éxito al hallar una vía plausible para adaptar y recrear el proceso en bacterias. Demostraron cómo convertir esa maquinaria natural en las bacterias y archaeas en una herramienta universal de edición programable, que servía para cortar cualquier cadena de ADN en vivo.

Después de abundante evidencia experimental, Feng Zhang (en el *Broad Institute del MIT y Harvard*) fue más lejos, fue el primero en publicar un artículo donde demostraba que CRISPR servía en un sistema biológico más complejo, de orden superior, como la células eucariotas (humanas), lo que le valió la primera patente de propiedad intelectual en litigio con Doudna con fallo reciente (15/02/17) de la oficina de patentes de Estados Unidos a favor del primero.

El sistema CRISPR-Cas9 consta en su maquinaria de 2 componentes básicos, una enzima endonucleasa conocida como Cas9, que interactúa asociada a CRISPR, y un ARN (ácido ribonucleico) guía, una molécula

Las bacterias usan el sistema CRISPR para luchar contra los virus. Usando la proteína Cas9 se puede comandar en el laboratorio el mismo sistema para editar genes.

El ARN g dirige la proteína Cas9 para romper la hebra del ADN en una localización precisa.

En el laboratorio es posible reprogramar el sistema para editar cualquier sección seleccionada del ADN intercambiando diferentes ARN guías.

En la naturaleza, el sistema CRISPR es usado para cortar virus. En el laboratorio, el CRISPR es usado de dos maneras diferentes. Este puede eliminar genes indeseables "knock out" o insertar nuevo ADN.

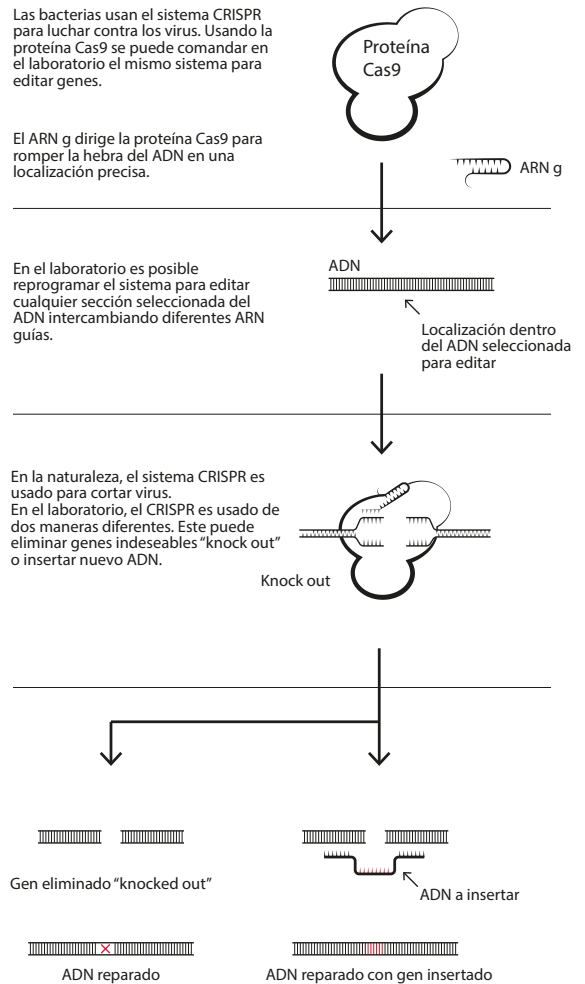


Figura 1.

la de cadena sencilla que juega un papel vital en la codificación, decodificación, la regulación y expresión de genes.

Cas9, una proteína especializada en cortar ADN, es capaz de romper un enlace en la cadena de los ácidos nucleicos. Cas9 es dirigido a una localización precisa por un ARN corto, el ARN guía.

El ARN guía, específico de una secuencia concreta del ADN, direcciona a la enzima Cas9 a su objetivo en el ADN y le indica el *locus* de interés donde cortar. Se diseñan moléculas sintéticas o programables del ARN guía con la secuencia deseada y de la proteína Cas9, que son producidas *in vitro* y luego liberadas en las células por diferentes mecanismos.

El complejo CRISPR/Cas "busca" una secuencia complementaria en la cadena del ADN. Cuando la encuentra, produce un corte e introduce los cambios. Usando la proteína Cas9, los científicos pueden comandar el mismo sistema para editar genes provocando su disrupción y reprogramando cualquier sección deseada del ADN y cambiarlo. Con este sistema es ahora más fácil editar o modular en cualquier organismo que elijamos.

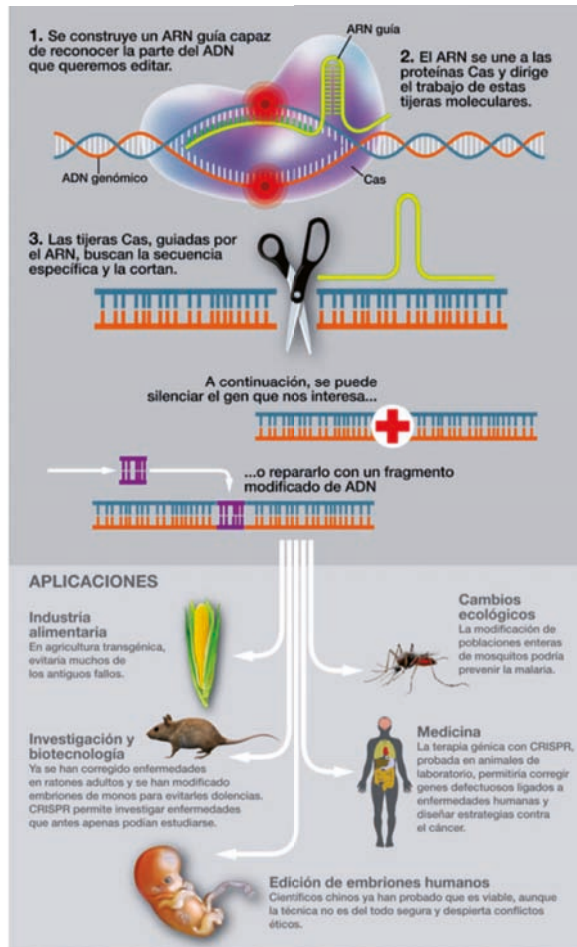


Figura 2. http://www.eldiario.es/cultura/ciencia/CRISPR-Cas9-corta-pegas_0_583042215.htm

En una 2da etapa se activan al menos dos mecanismos naturales de reparación del ADN cortado. El primero es llamado InDel (inserción-delección); en el sitio de corte aparece un hueco en la cadena o bien se inserta un trozo más de cadena, y esto lleva a la pérdida de la función original del segmento de ADN cortado. Un segundo mecanismo permite la incorporación en el sitio de corte de una secuencia concreta que queremos que se integre en el ADN.

En la naturaleza, el sistema CRISPR es usado para cortar virus en los genomas bacterianos y de las arqueas.

En el laboratorio es usado desde el 2013 de diferentes formas: puede remover genes indeseables o insertar nuevo ADN en el lugar de elección, introduciendo cambios específicos en posiciones concretas, corrigiendo errores en los genes responsables de causar enfermedades.

La interrupción del gen es fácil con las actuales tecnologías. Editar el genoma humano era posible por varios años pero era lento, costoso, impreciso y con grandes dificultades. La tecnología basada en el CRISPR-Cas9 asociada a ARN-guía es una vía más rápida que las técnicas previas de edición del ADN.

CRISPR-Cas9 trabaja en forma análoga a un moderno procesador de palabra, corrigiendo, intercalando pala-

bras o borrando otras para programar el código de las células (Figuras 1 y 2).

PERSPECTIVAS

CRISPR asociada a Cas9 es una herramienta de edición de genes que ha emergido como una invaluable tecnología para lograr la manipulación del genoma somático y la línea germinal en células y organismos modelos.

Las posibilidades de manipular secuencias de DNA, de manera predictiva, por CRISPR-Cas tiene múltiples e innovativas aplicaciones en biología molecular que transformarán las ciencias básicas, la biotecnología y la medicina.

La enfermedad cardiovascular (ECV) tiene una etiología multifactorial, biológicamente compleja, relacionada con factores de riesgo metabólicos, genéticos, ambientales y de comportamiento que trabajan en conjunto y que encontraba significativos impedimentos para la comprensión de su fisiopatología.

Los avances de la biología molecular y celular permiten desentrañar las vías moleculares y las causas genéticas involucradas en las disfunciones cardiovasculares de la enfermedad.

Los objetivos terapéuticos actuales apuntan a actuar sobre esta base contribuyendo al desarrollo de nuevos tratamientos para las enfermedades cardiovasculares.

La edición genómica permite la creación de terapias enfocadas en los factores de riesgo genéticos de la EAC. Objetivos como la angiogénesis, la apoptosis y la disfunción endotelial no pueden ser manipulados farmacológicamente lo que los convierte en candidatos para la terapia génica para suprimir factores genéticos relacionados con la EAC.

En la actualidad hay varios laboratorios de investigación que están utilizando la herramienta de CRISPR-Cas9 para editar genes involucrados en la ECV, llevando adelante ensayos preclínicos más informativos y programando estudios clínicos.

La aplicación de la edición de genoma ha sido rápidamente adoptada en muchos campos incluido el cardiovascular, donde ha facilitado un mayor conocimiento del cardiomiocito, un nuevo punto de vista del metabolismo de lípidos, la electrofisiología, las miocardiopatías, la aortopatía y otros desórdenes cardiovasculares. Especialmente, ha ayudado a crear una variedad de modelos animales con deficiencias genéticas específicas que quieran ser estudiadas, para una nueva clase de prevención y terapia. Por ejemplo, se ha utilizado el pez cebra para generar modelos de hipertensión, desarrollo vascular, cardíaco y enfermedad heredada y adquirida.

Se investiga, por su viabilidad y versatilidad, un ancho rango de aplicaciones terapéuticas, avanzando en muchas áreas de las ciencias de la vida, especialmente para aplicaciones clínicas y gen terapia.

Reducir el riesgo de enfermedad cardiovascular es su promisorio objetivo.

La reparación de la maquinaria endógena del ADN para la pérdida de función de alelos mutantes o realizar precisas modificaciones en células posmitóticas tales como neuronas o miocitos cardíacos posibilitando la estimulación de funciones relacionadas con la supervivencia de cardiomiocitos en el período posinfarto o induciendo la migración, proliferación y diferenciación de células madre para distintas condiciones cardiovasculares.

Numerosos desafíos existen por delante para tratar los desórdenes lipídicos.

La disrupción y edición de genes puede proveer efectos terapéuticos en la reducción permanente de niveles de colesterol en sangre en pacientes tratados con estatina que son resistentes o no responden bien. Un ejemplo de esto son investigaciones centradas en la inhibición de la función de PCSK9 que degrada los receptores de LDL y provoca el aumento del nivel de lipoproteínas en sangre. Ding y colaboradores (2014), a través del sistema CRISPR-Cas9, introdujeron una pérdida de función para el gen PCSK9 en los hígados de ratones y mostraron una disminución de los niveles de colesterol del 40%.

Otro estudio por edición genómica inhibía genes conectados a la ECV alterando la apolipoproteína E (ApoE).

El uso de CRISPR-Cas9 en el sistema beta adrenérgico contribuye al estudio de la hipertensión arterial.

Inhibir la progresión de la cardiomiopatía dilatada, modificando los factores que conducen al remodelamiento ventricular patológico y mejorar la fracción de eyección en estos pacientes es otro de los esfuerzos para incrementar el conocimiento de esta patología mediante Cas9 cardioespecífica.

La factibilidad técnica de alterar genes asociados con varias condiciones cardíacas facilita y estimula la generación, desarrollo y accesibilidad de nuevas drogas útiles, seguras y debajo costo y terapéuticas médicas que podrán provocar la disrupción de todo el ecosistema de la patología cardiovascular.

La edición genómica es una perfecta herramienta para el control y cura de causas genéticas o epigenéticas asociadas con funciones biológicas alteradas o enfermedades cardíacas para las cuales no hay terapias o debido a

que la localización subcelular de sus causas no son accesibles a los agentes farmacológicos.

Permite manipular o alterar genéticamente en el laboratorio parásitos como el tripanosoma causante de enfermedades como el Chagas o emplear ingeniería de mutación en la población de mosquitos para inactivarlos y detener la malaria.

Una excitante dirección futura es el uso de la tecnología basada en Cas9 en el tratamiento de desórdenes genéticos como fibrosis quística, anemia *sickle-cell* o distrofia muscular de Duchenne para corregir la mutación causal.

Una aplicación adicional de CRISPR-Cas9 es incorporar nuevas drogas más efectivas contra el cáncer y mejores antivirales para combatir la infección HIV, bajando sus niveles o hacerlos indetectables.

El uso de la tecnología de edición de genes en reproducción humana, para la modificación genética de la línea germinal (ingeniería *germline* humana), genera un debate sobre consideraciones éticas con mayor *focus* en cómo o cuándo o con qué propósito CRISPR puede ser usado para hacer cambios hereditarios en el genoma humano. Recientemente, la FDA ha dado su aprobación a la investigación de la Universidad de Pennsylvania para conducir un estudio clínico cuyo objetivo son tres genes implicados en el cáncer.

Como toda nueva técnica, el riesgo debe ser bien valorado y medido. La inactivación de genes tiene la habilidad de alcanzar beneficios terapéuticos permanentes sin la necesidad de tratamiento continuo que requiere una administración repetida de drogas o tratamientos paliativos.

Las futuras soluciones mediante la modificación de genes serán encontradas al comprender y refinar nuestro conocimiento y mejorar la especificidad de Cas9 en su *target* de enfermedades cardíacas.

CRISPR-Cas9 tiene mucho que ofrecer pero, como todas las terapias génicas, cada propósito de uso en cardiología tiene que tener un *ratio* favorable riesgo-beneficio.

Es posible vislumbrar los beneficios relacionados con la corrección de genes de riesgo o enfermedad cardíaca. Están en el horizonte, recién se abre la puerta a este conocimiento, pero todavía hay un largo camino para alcanzar su completo potencial científico y terapéutico.

BIBLIOGRAFÍA

- Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, et al. (2007). CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science* 2007;315(5819):1709-12. (Este estudio que demostró que CRISPR-Cas loci provee inmunidad adquirida contra bacteriófagos).
- Cho SW, Kim S, Kim JM, Kim JS. Targeted genome engineering in human cell with the Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nat Biotechnol* 2013;31(3):230-2.
- Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* 2013;339(6121):819-23.
- Gupta RM, Meissner TB, Cowan CA, Musunuru K. Genome-edited human pluripotent stem cell-derived macrophages as a model of reverse cholesterol transport—brief report. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2016;36(1):15-8.
- Hsu PD, Lander ES, Zhang F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell* 2014;157(6):1262-78
- Jansen R, Embden JD, Gastra W, Schouls LM. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Mol Microbiol* 2002;43(6):1565-75. (Primera descripción de secuencias de Cas como una familia de genes asociados con repeticiones de CRISPR).

- Jiang W, Bikard D, Cox D, Zhang F, Marraffini LA. RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems. *Nat Biotechnol* 2013;31(3):233-9.
- Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 2012;337(6096):816-21. (Primera descripción que mostró cómo convertir la maquinaria natural en las bacterias y arqueas en una herramienta de edición programable, que servía para cortar cualquier cadena de ADN en vivo).
- Jinek M, East A, Cheng A, Lin S, Ma E, Doudna J. RNA programmed genome editing in human cells. *eLife* 2013;2:e00471.
- Luria SE, Delbruck M. Mutations of bacteria from virus sensitivity to virus resistance. *Genetics* 1943;28(6):491-511.
- Marraffini LA, Sontheimer EJ. Self versus non-self discrimination during CRISPR RNA directed immunity. *Nature* 2010;463(7280):568-71.
- Marraffini LA, Sontheimer EJ. CRISPR interference limits horizontal gene transfer in staphylococci by targeting DNA. *Science* 2008;322(5909):1843-5. (Un trabajo del argentino Marraffini demostrando que CRISPR-Cas loci tiene por objetivo una secuencia específica de moléculas de ADN, destacando por primera vez el potencial de la aplicación tecnológica de este sistema).
- Mojica FJ, Díez-Villaseñor C, Soria E, Juez G. Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria.
- *Mol Microbiol* 2000;36:244-46. (Primera descripción de CRISPR loci como una nueva familia de secuencias repetitivas en prokariotas).
- Mojica FJ, Díez-Villaseñor C, García-Martínez J, Soria E. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *J Mol Evol* 2005;60:174-82.
- Nelson CE, Hakim CH, Ousterout DG, Thakore PI, Moreb EA, Castellanos Rivera RM, et al. In vivo genome editing improves muscle function in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Science*. 2016;351(6271):403-7.
- Niimi M, Yang D, Kitajima S, Ning B, Wang C, Li S, et al. ApoE knockout rabbits: a novel model for the study of human hyperlipidemia. *Atherosclerosis* 2016;245:187-93.
- Nishimasu H, Ran FA, Hsu PD, Konermann S, Zhang F. Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA. *Cell* 2014;156:935-49.
- Sakurai T, Sakurai A, Vaisman BL, Amar MJ, Liu C, Gordon SM, et al. Creation of apolipoprotein C-II (ApoC-II) mutant mice and correction of their hypertriglyceridemia with an apoC-II mimetic peptide. *J Pharmacol Exp Ther* 2016;356(2):341-53.
- Shiba Y, Fernandes S, Zhu WZ, Filice D, Muskhevi V, Kim J, et al. Human ES-cell-derived cardiomyocytes electrically couple and suppress arrhythmias in injured hearts. *Nature* 2012;489(7415):322-5.
- Sternberg SH, Redding S, Jinek M, Greene EC, Doudna JA. DNA interrogation by the CRISPR RNA guided endonuclease Cas9. *Nature* 2014;507(7490):62-7.
- Tabebordbar M, Zhu K, Cheng JK, Chew WL, Widrick JJ, Yan WX, et al. In vivo gene editing in dystrophic mouse muscle and muscle stem cells. *Science* 2016;351(6271):407-11.
- Wang T, Wei JJ, Sabatini DM, Lander ES. Genetic screens in human cells using the CRISPR-Cas9 system. *Science* 2014;343, 80-84.
- Wang X, Raghavan A, Chen T, Qiao L, Zhang Y, Ding Q, et al. CRISPR-Cas9 targeting of PCSK9 in human hepatocytes in vivo - brief report. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2016;36(5):783-6.
- Wang Y, Liang P, Lan F, Wu H, Lisowski L, Gu M, et al. Genome editing of isogenic human induced pluripotent stem cells recapitulates long QT phenotype for drug testing. *J Am Coll Cardiol* 2014;64(5):451-9.
- Wu Y, Liang D, Wang Y, Bai M, Tang W, Bao S, et al. Correction of a genetic disease in mouse via use of CRISPR Cas9. *Cell Stem Cell* 2013;13(6):559-62.
- Yin H, Xue W, Chen S, Bogorad RL, Benedetti E, Grompe M, et al. Genome editing with Cas9 in adult mice corrects a disease mutation and phenotype. *Nat Biotechnol* 2014;32(6):551-3. *Epub* 2014 Mar 30.

Información suplementaria

Se pueden hallar videos en You Tube, como *Genome Editing with Crispr-cas9*; CRISPR reactivos está disponible para la comunidad académica a través de Addgene; y protocolos, *forum* y herramientas computacionales se encuentran disponibles vía el sitio web del laboratorio Zhang (<http://www.genome-engineering.org>).

COMPAÑÍAS CRISPR STARTUPS

- **Editas Medicine IPO** Cambridge, Mass. Posee la licencia del Broad Institute del MIT y Harvard con las aplicaciones de la invención de Zhang.
- **Caribou Biosciences**, sede en Berkeley posee la licencia exclusiva sobre las investigaciones CRISPR-Cas9 realizadas por Doudna.

- **Oxitec**
 - **Intellia Therapeutics IPO**
 - **Crispr Therapeutics**, con sede en Basilea, Suiza, licencia las invenciones de la Universidad de Viena donde trabajó Charpentier.
 - **Parker Institute**
 - **eGenesis** con sede en Boston, produce cerdos clonados, modificados genéticamente para trasplante de órganos.
- IPO (*initial public offering*). Las acciones de una compañía privada es ofrecida públicamente transformándose en una empresa pública.