

CRISPR-Cas9 como terapia de protección de enfermedades cardíacas

CRISPR-Cas9 as protective therapy for heart disease

David Vetcher¹

RESUMEN

El uso de la tecnología CRISPR para la edición de genes ha iniciado una nueva era en biología y medicina. Las tecnologías CRISPR pueden modificar el genoma de cualquier célula eucariota especialmente humana, de una manera fácil, rápida, económica y precisa. Esta nueva modalidad ofrece un enfoque terapéutico prometedor para la protección y el tratamiento de las enfermedades cardíacas mediante la reescritura de la base genética de la enfermedad, corrigiendo los errores o defectos genéticos responsables.

Palabras clave: sistema CRISPR-Cas9, tecnología de edición de genes, terapia génica cardiovascular.

ABSTRACT

The use of CRISPR technology for gene editing has launched a new era in biology and medicine. CRISPR technologies can modify the genome of any eukaryotic cell in an easy, fast, economical, and precise way. This new modality offers a promising therapeutic approach for protection and treatment in heart disease via the rewriting of the genetic basis of disease.

Key words: CRISPR-Cas9 system, gene editing technology, cardiovascular gene therapy

Revista Argentina de Cardioangiología Intervencionista 2022;13(2):61-67. <https://doi.org/10.30567/RACI/202202/0061-0067>

INTRODUCCIÓN

Cuando en febrero de 2017 enviamos a la *Revista Argentina de Cardioangiología Intervencionista*, órgano oficial del Colegio Argentino de Cardioangiólogos Intervencionistas (CACI), el artículo “Impacto y oportunidad de CRISPR-Cas9 en Cardiología”, aceptado el 16 de mayo de 2017 y publicado en el número 2 (abril-junio) de 2017¹, hace ya casi 5 años, no sabíamos con el Editor, el Dr. Alfredo Rodríguez, qué impacto de lectura tendría el artículo, sobre todo por tratarse de un área científica cuasi ajena a nuestra disciplina, donde el listado de prioridades de lecturas es otro.

Contrariamente a lo que pensábamos, sí despertó interés y así nos lo hicieron saber algunos más atentos a lo que sucede en otras disciplinas, por aquello que estaba cambiando conceptualmente en el mundo de la biología del ADN y ARN. Hoy, luego del otorgamiento del Nobel de Química 2020 a las laureadas Jennifer Doudna de la Universidad de California, Berkeley (**Figura 1**), y Emmanuelle Charpentier de la Universidad de Umea (Suecia) por el descubrimiento en 2012 de un significativo *landmark* de la nueva y poderosa tecnología de edición de genes, CRISPR-Cas9, 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 in vivo, queremos nuevamente llamar la atención sobre este sistema como una prometedora terapia de protección de enfermedades cardíacas.

Anticipábamos entonces que esta tecnología genética, disruptora en todos los laboratorios de investigación de biología molecular, era una ciencia de premio Nobel y que se había generado una carrera hacia la obtención de esa meta.

Se inauguraba así una nueva era en la biología en la que se podía editar, es decir, corregir, alterar, borrar, insertar o, con términos más precisos, mediante inserción-delección de pares de bases concretos en el sitio de corte del ADN, corregir errores de los genes responsables de causar enfermedades. Presenciábamos una revolución científica con la capacidad de modificar la secuencia en el genoma de cualquier célula eucariota, especialmente humana, de una manera fácil, rápida, barata y precisa.

La posibilidad de manipular secuencias de ADN de manera predictiva mediante CRISPR-Cas9 tiene múltiples e innovadoras aplicaciones potenciales y reales en medicina.

REDUCIR EL RIESGO DE ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR ES SU PROMISORIO OBJETIVO

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) tienen una etiología multifactorial, esto es, son biológicamente complejas, relacionadas con factores de riesgo metabólicos, genéticos, ambientales y de comportamiento que trabajan en conjunto, lo que desafía la comprensión de su etiopatogenia.

A diferencia de aquellos casos en que solo hay una mutación única que causa la enfermedad, las enfermedades cardíacas son causadas por una variedad de mutaciones diferentes. Corregir la única mutación es más fácil. Los avances de la biología molecular permiten desentrañar cada vez más las vías moleculares y las causas genéticas involucradas en las ECV. La edición de genes avanza tan rápido que las tecnologías de próxima generación ya están superando la CRISPR-Cas9, la última ratio, por una forma más precisa de 2da generación llamada edición de bases, que repara el defecto genético reemplazando un solo par de bases, corrigiendo la mutación

1. Expresidente del Colegio Argentino de Cardioangiólogos Intervencionistas.

✉ Correspondencia: David Vetcher. davidvetcher@gmail.com

El autor no declara conflictos de intereses.

Recibido: 05/03/2021 | Aceptado: 25/01/2022

en un punto, y por otras herramientas surgidas recientemente de los laboratorios para la inserción y delección de secuencias más grandes, oraciones completas en lugar de letras, incluso para cortar y pegar genes enteros².

EDICIÓN TERAPÉUTICA DEL GEN POR CRISPR-CAS9

Las terapias de genomas buscan corregir los errores o defectos genéticos

Recientemente la FDA ha dado aprobación para conducir estudios clínicos hacia el objetivo de desarrollar nuevas terapias para abordar las enfermedades cardíacas en el siglo XXI utilizando la edición génica CRISPR-Cas9 para el tratamiento de la principal causa de muerte en el mundo.

La edición de genes es una herramienta perfecta para el control y cura de causas genéticas cardioespecíficas asociadas a enfermedades cardíacas.

Con la intervención de estas tecnologías se pueden curar enfermedades que de otro modo requieren un tratamiento crónico o carecen de cualquier tratamiento (enfermedades huérfanas) accesible a los agentes farmacológicos.

El uso terapéutico de editores de genes y de bases en los trastornos genéticos corrige directamente la causa de la enfermedad en lugar de tratar sus síntomas. Utiliza un editor de genes para introducir una mutación específica, cuyo efecto es apagar la actividad del gen y de esa manera lograr la pérdida de la función.

Alterar genes asociados con varias condiciones cardíacas estimula la generación, desarrollo y accesibilidad de nuevas drogas seguras.

Los investigadores comenzaron a proponer formas de corregir enfermedades genéticas hace 50 años, en los '70. Los experimentos en terapia génica comenzaron en la década de 1990. Los hitos más importantes en esta corriente de investigaciones fueron: la aprobación del primer tratamiento por la FDA en 2017 de un defecto genético que conduce a la ceguera, y la segunda aprobación fue para el tratamiento de la enfermedad de desgaste muscular Zolgensma (Novartis). La terapia génica de 1era generación fue la terapia de transferencia de genes y la edición de genes y nuevas drogas basadas en ARN en la actualidad.

La acción terapéutica de estos medicamentos no sería como la de una vacuna, ya que no involucra al sistema inmunológico, pero el concepto es similar: una única terapia preventiva que conferirá una protección duradera y posiblemente de por vida contra las enfermedades cardíacas.

La inactivación de genes tiene la capacidad de alcanzar beneficios terapéuticos permanentes, sin la necesidad de tratamiento continuo que requiere una administración repetida de drogas. Por ejemplo, con CRISPR existiría la posibilidad de una terapia única inactivando permanentemente el gen PCSK9 con disminución del cLDL. Para siempre.

El objetivo a largo plazo es poder usar CRISPR-Cas9 en los pacientes y protegerlos de las enfermedades cardíacas durante toda la vida.

La clave para proteger la población en general podría estar en el mismo cuerpo.

CRISPR-Cas9 tiene mucho que ofrecer. Es posible vislumbrar los beneficios relacionados con la corrección de genes de riesgo de enfermedad cardíaca. Usar CRISPR-Cas9 para poner esas mismas mutaciones en personas normales y protegerlas contra enfermedades cardíacas.

Estamos en los comienzos de estos nuevos conocimientos; la terapia génica ofrece una nueva esperanza a las personas con enfermedades genéticas, pero todavía hay un largo camino para alcanzar su completo potencial terapéutico y hacer la edición de genes lo más segura y efectiva posible.

Edición de genes terapéuticos de PCSK9

La relación entre enfermedad arterial y cLDL se ha demostrado por un amplio cuerpo de información científica³.

Grupos de investigadores alimentaron a algunos ratones con dietas altas en colesterol y a otro grupo con dietas bajas en colesterol. En muestras de hígado de sus ratones analizaron los datos para ver qué genes se veían más afectados por la adición de colesterol a la dieta. Estos genes codifican proteínas implicadas en la producción de colesterol.

Cuando el hígado detecta que no ingresa suficiente colesterol al cuerpo a través de la dieta, tiene la capacidad de tomar el relevo produciendo moléculas de colesterol. Por el contrario, si hay suficiente colesterol en el cuerpo, el hígado reduce su producción.

En estos estudios notaron que había un gen que nunca antes se había estudiado. Se especuló que este gen podría codificar una proteína desconocida involucrada en la producción de colesterol. Estaban a la búsqueda, rastrearon esa proteína que llamarían proproteína convertasa subtilisina / kexina tipo 9, o PCSK9^{4,5}.

La identificación y el descubrimiento de la PCSK9 ocurrió en el año 2003 como resultado de la investigación realizada con familias con hipercolesterolemia familiar (HF). Se utilizó un virus para llevar el gen al hígado de los ratones, lo que tuvo el efecto de aumentar la producción de la proteína PCSK9. Observaron que los niveles de colesterol LDL de los ratones se dispararon en respuesta al aumento de la proteína. Más PCSK9 equivale a más colesterol LDL, lo que significa un mayor riesgo de enfermedad cardíaca.

Esto despertó el interés en desarrollar terapias utilizando la nueva tecnología de edición de genes y silenciar los genes que causan enfermedades.

Jonathan Cohen y Helen Hobbs, del Centro Médico Southwestern de la Universidad de Texas, publicaron un estudio histórico sobre PCSK9 en el *New England Journal of Medicine* con el hallazgo de que el aumento de la actividad de PCSK9 causaba HF^{6,7}. Mapearon un gen responsable en una región particular del cromosoma 1 que tenía mutaciones en el gen PCSK9. Así se estableció que las mutaciones del paciente que causaban HF estaban haciendo que la proteína funcionara mejor de lo normal, es decir, fuera hiperactiva. Las mutaciones que hacen que una proteína sea hiperactiva, que funcione mejor de lo normal, son bastante inusuales; las mutaciones que inactivan una proteína son mucho más comunes.

Dado que las mutaciones hiperactivas aumentaron el colesterol LDL, los investigadores esperaban encontrar mutaciones inactivadoras de PCSK9 en la población, que presumiblemente disminuirían el colesterol LDL. Secuenciaron el gen PCSK9 en 128 personas con colesterol LDL bajo, donde identificaron dos mutaciones sin sentido de PCSK9. Encontraron que el tres por ciento llevaba una copia de una de las mutaciones. Ese tres por ciento no solo tuvo una reducción del treinta por ciento en los niveles de colesterol LDL, sino que también tuvo una reducción del noventa por ciento en el riesgo de enfermedad de

las arterias coronarias. Sus mutaciones de *PCSK9* les habían conferido naturalmente esta protección.

Varias publicaciones establecen que CRISPR-Cas9 podría funcionar muy bien. Ding y colaboradores a través del sistema CRIPR-Cas9 obtuvieron la pérdida de función de *PCSK9* en hígados humanizados de ratones hasta el punto de disminuir los niveles de colesterol LDL en 35-40%⁸.

Lograr con CRISPR-Cas9 apagar la actividad del gen y reducir el nivel de colesterol obteniendo el efecto equivalente a las personas que nacieron con una mutación (en solo 1 de las 2 copias) del gen *PCSK9*, que tienen niveles muy bajos de colesterol que reduce aproximadamente el 90% del riesgo de enfermedad de las arterias coronarias.

Si estos resultados se traducen a los seres humanos, sería similar a tomar todos los días durante el resto de la vida, una pastilla de estatina para reducir el colesterol. En este caso podría ser posible obtener el mismo efecto terapéutico que las estatinas con una sola inyección de edición del gen *PCSK9*.

La proteína *PCSK9* en el torrente sanguíneo podría reducirse en gran medida silenciando su fuente genética en el hígado con interferencia de ARN, lo cual debería resultar en un menor colesterol LDL y un menor riesgo de enfermedad cardíaca, tal como se ve con las mutaciones de *PCSK9* que ocurren naturalmente. Estas personas que carecían de *PCSK9* eran sanas, lo que sugirió que un fármaco dirigido a silenciar *PCSK9* sería seguro. De esta manera buscaban lograr el efecto equivalente editando *PCSK9* con CRISPR-Cas9 para beneficiar a los pacientes.

La estrategia era simple administrar CRISPR-Cas9 en el hígado, inactivar permanentemente el gen *PCSK9* y observar como la cantidad de proteína *PCSK9* en sangre disminuye y los niveles de colesterol LDL en sangre caen (en 35-40%) y alcanzar una reducción de aproximadamente un 90% en el riesgo de enfermedad de las arterias coronarias, para siempre. Todo lo que se necesita es apagar la actividad del gen

Mecanismo de acción

El gen *PCSK9* se encuentra en el cromosoma 1p32.3 y se expresa principalmente en el hígado y el intestino delgado, que desempeñan un papel clave en la síntesis y la regulación del colesterol.

La *PCSK9* circulante se une al receptor de LDL (rLDL) en la membrana celular de los hepatocitos y reduce el número de rLDL de superficie hepática, a la vez que aumenta los niveles plasmáticos de cLDL.

El aumento de la producción de *PCSK9* degrada los rLDL; esto se asocia con una disminución en la actividad del receptor lo que deriva en elevación en los niveles de cLDL en sangre.

Se demostró por el contrario que las reducciones en la producción de *PCSK9* debidas a mutaciones con pérdida de función están asociadas con niveles reducidos de cLDL y disminución del riesgo cardiovascular.

Grupos de investigadores convergieron en el estudio de este gen. Estudiaron a pacientes con niveles altísimos de colesterol LDL, que ponen a las personas en riesgo de enfermedad cardíaca, específicamente enfermedad de las arterias coronarias que causa ataques cardíacos. Estos pacientes tenían niveles tan altos que sufrían ataques cardíacos desde la infancia. La condición parecía ser hereditaria, por lo que se les diagnosticó la enfermedad conocida como hipercolesterolemia familiar.

La hipercolesterolemia familiar (HF) es un trastorno hereditario del metabolismo lipídico, que cursa con niveles elevados de cLDL. La HF es la enfermedad monogénica más frecuente en los seres humanos. En Argentina, el estudio de Corral y cols. mostró una prevalencia de HF heterocigota de 1:291 en el partido de General Pueyrredón implementando criterios clínicos para el diagnóstico⁹. La HF está vinculada a la mutación en el gen del receptor para LDL. Este receptor es el principal responsable de la captación de lipoproteínas LDL. Tales mutaciones reducirán la habilidad del receptor de ingresar LDL de la sangre hacia las células, conduciendo a niveles de cLDL aumentados desde etapas muy tempranas del desarrollo. La exposición a niveles elevados de cLDL durante toda la vida lleva a estos pacientes a desarrollar enfermedad coronaria en forma prematura. Los portadores de HF menores de 40 años mostraron 100 veces más riesgo de padecer un evento cardiovascular que la población general. Por su riesgo elevado y oportunidad de reducirlo con el uso apropiado de hipolipemiantes, esta patología ha sido foco de múltiples estudios con iPCSK9 y se considera que estos fármacos serán una gran herramienta en el manejo de la HF.

La industria farmacéutica pronto se interesó y lanzó un programa de desarrollo en torno a *PCSK9*. Después de una década de trabajos, el fármaco resultante, inclisiran, ha demostrado ser muy eficaz y seguro para reducir en ensayos clínicos los niveles de colesterol LDL en pacientes con enfermedades cardíacas. El medicamento parece estar en camino de ser aprobado por la Administración de Drogas y Alimentos de EE. UU.

Varias empresas decidieron inhibir la proteína *PCSK9* directamente en el torrente sanguíneo, desarrollando una nueva opción terapéutica, los inhibidores de *PCSK9* (iPCSK9). Crearon anticuerpos sintéticos que capturan la *PCSK9* y la neutralizan, siguiendo el modelo de anticuerpos humanos naturales que combaten las infecciones. Dos de esos anticuerpos monoclonales, alirocumab y evolocumab, obtuvieron la aprobación de la FDA en 2015. En los años siguientes, grandes ensayos clínicos mostraron que ambos medicamentos reducen el riesgo de problemas cardíacos en pacientes de alto riesgo. Los iPCSK9 constituyen un nuevo grupo de hipolipemiantes con impacto en la reducción del cLDL y eventos cardiovasculares. Pero el análisis de costo-efectividad de estos medicamentos es tema de debate¹⁰, no han demostrado ser tan populares como se esperaba por el alto precio que tienen y el régimen de administración (el fármaco debe inyectarse debajo de la piel, cada pocas semanas, durante el resto de la vida del paciente. Una propuesta poco atractiva en comparación con la ingesta diaria de una pastilla, que es el caso de las estatinas, la forma tradicional de reducir el colesterol.

Es preciso definir qué población de pacientes será más favorecida por los iPCSK9 antes de sumar un nuevo fármaco a su tratamiento.

El umbral de cLDL es un determinante para la indicación, reservando este recurso farmacológico al grupo de pacientes de mayor riesgo, con un nivel mayor de cLDL. Su seguridad y eficacia han sido demostradas en ensayos clínicos que avalan su utilización, aunque la evidencia a largo plazo aún es escasa.

A pesar de estos problemas, *PCSK9* es ampliamente considerado como una historia de éxito para la genética: solo doce años entre el descubrimiento del gen y la aprobación de medicamentos para su uso en pacientes.

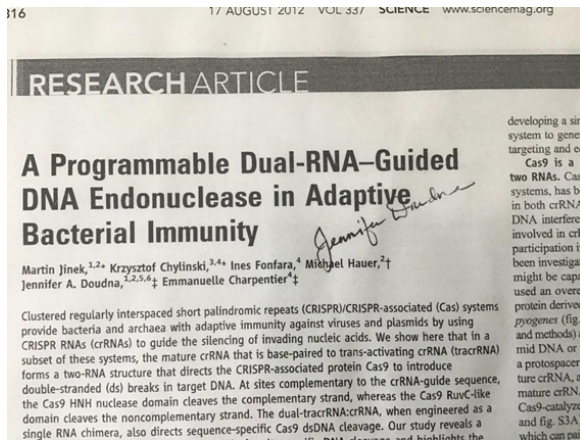


Figura 1 Jinek M, Chylinski k, Fonfara I, Hauer M, Douda JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 2012;337(6096):816-21.

MUTACIONES INACTIVADORAS DEL GEN ANGPTL3

Existe otro gen llamado *ANGPT3* ubicado en el cromosoma 1, cuya proteína que codifica se produce en el hígado y es secretada al torrente sanguíneo, donde apaga una enzima que metaboliza los triglicéridos.

Cuando este gen es portador de mutaciones inactivadoras que silencian la actividad de la proteína, explica los niveles bajos de triglicéridos y colesterol LDL y HDL

Los miembros de una familia afectados con esta condición hereditaria beneficiosa, una hipobetalipoproteinemia con la combinación de niveles muy bajos de colesterol LDL, triglicéridos y también de colesterol HDL, no tenían proteína *ANGPTL3* funcional debido a sus mutaciones naturales (lo que los genetistas llaman *knockouts*) y gozaban de un efecto protector contra la enfermedad coronaria. Ellos estaban en perfecta salud, sin efectos nocivos de ningún tipo por no tener *ANGPTL3* en funcionamiento.

A diferencia de *PCSK9*, en que las mutaciones ocurren en el 3% de la población, las mutaciones de *ANGPTL3* son más raras. Reducen en más de 1/3 el riesgo de enfermedad coronaria y también hay evidencia de que las mismas mutaciones reducen el riesgo de diabetes tipo 2. Un resultado de cuádruple impacto: menor colesterol, menor triglicéridos, menor enfermedad cardíaca y menor riesgo de diabetes.

Varias empresas han desarrollado activamente terapias con *ANGPTL3* tratando de recrear estas mutaciones naturales y hasta ahora sus medicamentos han funcionado bien en ensayos clínicos reduciendo tanto el colesterol LDL como los triglicéridos¹¹.

GEN DE VIH

Otro gen, el *CCR5*, de VIH está en el objetivo farmacológico mediante la mutación inactivadora (delección de ambas copias del gen *CCR5*).

El VIH se adhiere a la proteína de superficie CD4 del linfocito T para ingresar a la célula, pero necesita además un factor adicional para infectarlas, una proteína de superficie llamada *CCR5*.

Una nueva forma de combatir el virus consiste en lograr la completa ausencia de *CCR5* en la superficie de las células T, lo cual le confiere alta resistencia contra la infección del virus de inmunodeficiencia.

ENFERMEDAD DE CHAGAS

Es posible detener la enfermedad de Chagas alterando genéticamente en el laboratorio parásitos como el *Trypanosoma cruzi*, causante de esta enfermedad. La secuenciación y estudio genómico del *T. cruzi* constituye una vía para erradicar el parásito y prevenir la tripanosomiasis, mediante una nueva terapia genómica.

El Chagas es una enfermedad desatendida que constituye un reto de investigación genética¹². Existe la hipótesis de un proceso de reactividad cruzada entre los factores dependientes del parásito y la genética del huésped, promotora de la enfermedad.

Los estudios de genes HLA indican la existencia de susceptibilidad a la infección y/o desarrollo de la cardiomiopatía chagásica asociada con componentes genéticos de los pacientes, que crean nuevas oportunidades para tratar el mal de Chagas

AMILOIDOSIS CARDÍACA

La amiloidosis variante genética o hereditaria (AhTTR) es causada por una proteína llamada transtiretina. La proteína ofensiva es producida solo por el hígado a partir de un gen llamado *TTR*, que se encuentra en el cromosoma 18 humano, y se exporta al torrente sanguíneo.

Es una enfermedad rara, de base genética, causada por una mutación en el gen que codifica la transtiretina, que provoca que esta no se pliegue correctamente y precipite en forma de fibras de amiloide¹³.

En algunos pacientes, la transtiretina forma grumos llamados amiloide mientras está en la sangre, que luego terminan depositados en órganos como el corazón y los nervios periféricos. A medida que los grumos se acumulan en los órganos, pueden causar problemas potencialmente mortales. En el corazón engrosado con estos grumos de amiloide, el único recurso es un trasplante de corazón. Fuera de esto, no existe ningún otro tratamiento para la amiloidosis cardíaca, solo nos queda manejar su insuficiencia cardíaca.

La transtiretina no parece tener ningún propósito esencial en el cuerpo, por lo que si el gen *TTR* es silenciado por la interferencia del ARN, no debería haber efectos secundarios graves. Si la producción de transtiretina se corta en la fuente, no hay transtiretina en la sangre, lo que significa que no hay grumos de amiloide.

Es posible que, con el tiempo, los grumos que ya están en el corazón se eliminen. Incluso si eso no sucediera, el tratamiento podría detener o incluso revertir la progresión de las manifestaciones cardíacas de la amiloidosis AhTTR evitando que la afección empeore.

La industria farmacéutica decidió desarrollar fármacos. Después de que los datos del ensayo clínico APOLLO demostraron que patisirán tendría capacidad para reducir la producción de transtiretina y mejorar la calidad de vida de los pacientes, fue aprobado por la FDA.

Fue el primer fármaco de interferencia de ARN (ARNi)¹⁴.

MIOCARDIOPATÍA HIPERTRÓFICA

Es una enfermedad hereditaria y tiene una mutación específica en el gen *MYBPC3*, que causa la enfermedad.

El equipo del biólogo reproductivo Shoukhrat Mitalipov de la Oregon Health & Science University, en Portland, reclu-

tó a un paciente con miocardiopatía hipertrófica hereditaria grave e inyectó CRISPR-Cas9 y un ADN sintético con la secuencia normal de *MYBPC3* en los cigotos. En algunos de los embriones resultantes, se había corregido el gen *MYBPC3* mutante del paciente¹⁵.

En teoría, los embriones corregidos genéticamente podrían haber sido implantados en el útero de una madre, que al nacer podrían estar libres de la enfermedad del padre, pero los embriones se destruyeron dentro de las dos semanas posteriores a la fertilización, luego de la investigación, para garantizar que esta se realizara de manera ética.

Mitalipov pensaba que pasarían de cinco a diez años antes de que la edición genética de embriones estuviera lista para su uso para prevenir enfermedades en los bebés.

Para 2017 no había barreras científicas para llevar embriones editados genéticamente desde el embarazo hasta el nacimiento, se podía realizar la edición de embriones humanos (muchos investigadores ya lo habían intentado). Lo único que ha impedido que naciera el primer bebé editado genéticamente fue que ningún investigador había estado dispuesto a cruzar esa línea.

El caso anunciado del Dr. He Jiankui a través de YouTube de que su equipo había producido los primeros bebés editados genéticamente –las gemelas Lulu y Nana, las primeras ciudadanas de la generación CRISPR, no se sabía si era un logro científico histórico o un fiasco– resultó un verdadero engaño.

La preocupación era de que la capacidad de editar los genes de los bebés estuviera al alcance de la mano. El objetivo era asegurar que no se hiciera prematuramente y, si algún día se iba a hacer, que se hiciera de manera transparente, ética y segura.

Una excitante dirección es el uso de la tecnología basada en

CRISPR-Cas9 en aplicaciones adicionales no cardiológicas que citaremos a modo informativo.

Los científicos buscan curas genéticas para otras enfermedades como la fibrosis quística, la distrofia muscular de Duchenne, la anemia de células falciformes (*sickle cell*), el VIH –bajando los niveles de infección o haciéndolos indetectables–, el Alzheimer, Parkinson, drogas inhibitorias más efectivas contra el cáncer –con la aprobación para conducir estudios clínicos cuyo objetivo son genes implicados en cáncer, como es el caso de sotorasib del laboratorio farmacéutico Amgen para desactivar mutación genética *KRAS G12C* que codifica una proteína causa de cánceres de pulmón, colorrectal y de páncreas–, la tirosinemia hereditaria tipo 1, para reproducción humana, en el desarrollo de kits diagnósticos de Covid-19 o SARS basados en el sistema CRISPR-Cas9.

También usando la edición de bases los investigadores (Francis Collins, Director de los US *National Institutes of Health*, y David Liu, de la *Harvard University*) han curado exitosamente la progeria en ratones. Este raro pero devastador síndrome genético es causado por la mutación en un gen que codifica una proteína llamada lámina A, que tiene un rol estructural en el núcleo de la célula y causa un envejecimiento prematuro en niños rápidamente.

Para concluir, George Church, un importante genetista de Harvard, vaticinó: “recuerden esta palabra, CRISPR; nos permite cambiar nuestra relación con la naturaleza”.

Realmente se puede usar CRISPR en humanos para cambiar el ADN, realmente nos permite cambiar la evolución humana, si queremos. Permitirá llevar la ingeniería del genoma humano a una escala sin precedentes.

La revolución ha comenzado

BIBLIOGRAFÍA

- Vetcher DJ. Impacto y oportunidad de CRISPR-Cas9 en Cardiología. *Rev Arg Cardioangiol Interv* 2017;8(2):62-6.
- Musunuru K. The CRISPR Generation: The Story of the World's First Gene-Editing Babies. *Editorial Book Baby* edición 21 octubre 2019 ISBN 978-1-54398-637-2
- Goldstein JL, Brown MS. A century of cholesterol and coronaries: from plaques to genes to statins. *Cell USA* 2015;161:161-72.
- Abifadel M, Varret M, Rabès JP, et al. Mutations and polymorphisms in the proprotein convertase subtilisin kexin 9 (PCSK9) cause autosomal dominant hypercholesterolemia. *Nat Genet* 34 (2003), pp 154-156.
- Abifadel M. Identification and characterization of new gain-of-function mutations in the PCSK9 gene responsible for autosomal dominant hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 2012;223:394-400.
- Horton J, Cohen J, Hobbs H. Molecular biology of PCSK9: its role in LDL metabolism. *Trends Biochem Sci* 2007;32(2):71-7 doi: 10.1016/j.tibs.2006.12.008
- Cohen JC, Boerwinkle E, Hobbs H. Sequence variations in PCSK9, low LDL, and protection against coronary heart disease. *N Engl J Med USA* 2006;354:1264-72.
- Ding Q, Cowan CA, Musunuru K, et al. Permanent alteration of PCSK9 with in vivo CRISPR-Cas9 genome editing. *Circ Res* 2014 Aug 15;115(5):488-92 doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115304351 Epub 2014 Jun 10
- Corral Pablo, Geller AS, Polisecki EY, et al. Unusual genetic variants associated with hypercholesterolemia in Argentina. *Atherosclerosis* 2018;277:256-61.
- Recomendaciones para el uso de inhibidores de PCSK9. Documento de posición de la SAC. *Rev Arg Cardiol Vol 85 Supl 6 Dic* 2017.
- Mutaciones inactivadoras del Gen ANGPTL3 Genetic and Metabolic Determinants of Plasma Levels of ANGPTL8. Oldoni F, Kozlittina J, Hobbs HH, Cohen JC. *J. atherosclerosis*. August 2021 331 DOI: 10.1016/
- Coura JR, Vinas PA. Chagas Disease: a new worldwide challenge. *Nature* 2010;465(7301 Supp):S6-S7.
- Merlini G, Bellotti V. Molecular mechanisms of amyloidosis. *N Engl J Med* 2003;349(6):583-96.
- Alnylam Pharmaceuticals. Clinical trials. Patisiran (hATTR AMYLOIDOSIS). APOLLO- Phase 3 study.
- Ma H, Marti-Gutierrez N, Park SW, et al. Correction of a pathogenic gene mutation in human embryos. *Nature* 2017;548(7668):413-9. DOI: 10.1038/nature23305 PMID: 28783728.
- 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;36:244-6.
- Marraffini LA, Sontheimer EJ CRISPR interference limits horizontal gene transfer in staphylococci by targeting DNA. *Science* 2008;322(5909):1843-5.

Material suplementario - Definiciones

Edición de genes

Consiste en la rotura de la doble cadena en el sitio de destino del ADN. La herramienta es el CRISPR-Cas9.

La edición hace referencia a un proceso mediante el cual se hace una modificación de un texto para eliminar errores, insertar nuevos fragmentos, eliminar palabras o párrafos con el objetivo de lograr la redacción que se desea.

Se denomina edición (del inglés *edition*: “corrección”) al acto mediante el cual se modifica la escritura de una obra o texto. Ese mismo concepto lo utilizamos con el código genético.

La doble hélice del ADN se rompe, se crea un quiebre físico, pero la célula tiene la máquina para repararlo y preservar el hilo de la vida. Sería como un procesador de texto para tu ADN. Puedes pensarlo como el cursor del Microsoft Word en el ADN: donde sea que hagas el corte es el equivalente al cursor en el procesador de texto del genoma, ahí puedes escribir una nueva palabra.

CRISPR

Acrónimo de *clustered regularly interspaced short palindromic repeats*, en español repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas. Acuñada por el español Francisco Mojica¹⁶, primera descripción de CRISPR como una nueva familia de secuencias repetitivas en procariontes.

En la naturaleza, el sistema CRISPR-Cas9 es usado para cortar virus en los genomas bacterianos y de las arqueas. Es un sistema inmunológico que da a las bacterias inmunidad a los virus, protegiéndolas de ellos. Es una respuesta inmune adaptativa que las vuelve resistentes a los virus.

Se almacena en el ADN genómico bacteriano un registro de infecciones virales pasadas, y usa esa información registrada para combatir futuras infecciones repetidas por los mismos virus.

Cuando aparece un invasor, la bacteria puede almacenar una parte del ADN invasor en su propio ADN (en el espaciador, entre las repeticiones). Cuando el invasor regresa, la bacteria hace una copia de ese espaciador y la entrega a la proteína Cas9 esta busca según las instrucciones contenidas en la molécula de ARN guía una coincidencia con la secuencia de bases (del virus) y entonces corta en ese lugar.

La naturaleza inventó CRISPR. ¿Cuántos años tiene CRISPR? Millones de años; las proteínas Cas participaban en la captura de secuencias de virus invasores.

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.

Un trabajo del investigador argentino Marraffini demostró que CRISPR-Cas9 tiene por objetivo una secuencia específica de la molécula de ADN, destacando por primera vez el potencial de la aplicación tecnológica de este sistema¹⁷.

Cas9

Es una proteína especializada en cortar ADN (tijeras moleculares). Es capaz de romper las hebras en la cadena de ácidos nucleicos. Es dirigida a una localización precisa por el ARN guía: buscan la secuencia específica y la cortan. Lleva la copia, busca su coincidencia y entonces corta.

ARN guía

Es un ARN corto, sintético, personalizado, programable, diseñado *in vitro*, que se construye con una secuencia específica de bases de la diana deseada. Luego es liberado en las células por diferentes mecanismos. Su función es direccionar a la enzima Cas9 a su objetivo (efecto GPS) en el ADN y le indica la dirección del *locus* de interés donde cortar.

Se programan, fácilmente se pueden intercambiar con diferentes secuencias y luego se usan para hallar y cortar.

Una parte de la secuencia (los primeros 20 pares de bases) debe coincidir con la del sitio del ADN objetivo.

Si es necesario cambiar la dirección en el ADN se reemplazan estas 20 bases con la secuencia buscada. Se puede cortar el ADN donde se quiera con solo cambiar esa pequeña parte del ARN.

Esto puede hacerse en el laboratorio en un tubo de ensayo, pero también dentro de la célula.

CRISPR-asociado Cas9

Es una herramienta de edición de genes.

Actualmente es el método de manipulación genética más simple, versátil, preciso y eficaz. Funciona cortando cualquier fragmento objetivo de ADN de doble hebra con una secuencia diana coincidente. CRISPR-Cas9 tiene capacidad de tratar cáncer, distrofia muscular, anemia de células falciformes, de reconocer y atacar cualquier pedazo de ADN en cualquier célula y organismo. Es una herramienta universal.

Es comparado con una tijera o navaja –molecular– que corta ADN.

Este sistema de selección de genes consta en su maquinaria de 2 componentes básicos, una enzima endonucleasa no específica, conocida como Cas9, que interactúa asociada a CRISPR, y un ARN guía.

La proteína Cas9 y el ARN (guía) se ensamblan en una unidad que escanea cualquier molécula de ADN de doble hebra con la que entra en contacto.

Trabaja en forma análoga a un moderno procesador de palabras corrigiendo, intercalando palabras o borrando otras para programar el código de las células.

Si se coloca en el núcleo de una célula humana, la máquina escaneará los 46 cromosomas del genoma humano.

Cuando se encuentra con la secuencia diana u objetivo, toma las primeras 20 bases con el que está diseñado el ARN guía y prueba si la secuencia de bases diseñada en el ARN coincide con la secuencia de pares de bases del ADN en esa ubicación. Si hay coincidencia perfecta (o a veces una secuencia casi perfecta), la máquina cortará ambas hebras de la molécula de ADN donde se quiere hacer un cambio, como un navegador GPS que ubica la dirección, el sitio donde se desea un cambio. Los procesos de reparación natural de la célula luego vuelven a unir los extremos cortados. Sin embargo, el proceso de reparación es propenso a errores y a menudo a insertar o eliminar una letra del par de bases.

Tiene múltiples aplicaciones potenciales para editar mejoras de genomas de semillas de cultivos, insectos, modelos genéticos y en medicina para desarrollar terapias experimentales para humanos.

Si es posible cortar un gen de una célula (*target*) y crear una ruptura en el sitio de interés, puedes cambiar el gen. Es una he-

ramienta útil que nos permite cambiar nuestra relación con la naturaleza, realmente nos permite cambiar la evolución humana si queremos, es así de profundo.

Edición de bases

Corrige solo mutaciones en un punto, donde la versión tóxica se diferencia en una sola letra. El trastorno es el resultado de una sola letra base incorrecta en un gen.

Es una tecnología de 2da generación de edición genética que se basó en CRISPR-Cas9, un modo completamente nuevo de edición génica, una forma más precisa que salió del laboratorio en 2016.

Hace posible utilizar un editor de bases para corregir una sola mutación causante de enfermedad siempre que la corrección implique un cambio de C a T (editor de base de citosina) o de A a G (editor de base de adenina).

Constituye un gran avance en el campo de la edición de genes de precisión, pues reemplaza un solo par de bases de ADN en el genoma con otro par de bases y hace innecesaria la rotura de la doble hebra, evitando que se produzcan mutaciones no deseadas resultantes del corte.

El 30% de los problemas genéticos conocidos son causados por mutaciones puntuales.

ADN

El ácido desoxirribonucleico es el material base de la vida. Conformar el mecanismo de la herencia, que transmite información genética de generación en generación.

Es la molécula química portadora de las instrucciones genéticas en los seres vivos escrita en 4 letras designadas por la primera letra de sus nombres químicos, A T G C.

Consiste en dos hebras que giran una en torno de la otra formando una doble hélice.

Cada ser vivo tiene su propio y único ADN que determina qué será ese ser, planta, animal o hombre.

Las secuencias específicas codifican genes específicos que a su vez proporcionan instrucciones para ensamblar proteínas específicas.

Sin embargo, si una mutación mezcla las letras, las instrucciones pueden confundirse y producen una versión diferente de la proteína, que causa una enfermedad.

ARN

El ácido ribonucleico normalmente transporta información genética del ADN a los ribosomas, las fábricas celulares que ensamblan las proteínas. Es un primo químico del ADN; como el ADN, tiene 4 letras (conocidas como bases) y puede formar pares con letras coincidentes en el ADN. A diferencia del ADN tiene una sola hebra.

Las letras en el ARN permiten que Cas9 halle una secuencia única en el ADN.

Genoma humano es como un libro, donde cada cromosoma es un capítulo diferente y cada gen una oración.

Si comparamos el genoma con una gruesa enciclopedia, el CRISPR encuentra una palabra específica en esa enciclopedia y la puede borrar o cambiar.

Cada célula humana tiene una colección de cuarenta y seis grandes moléculas de ADN, conocidas como cromosomas, contenidos dentro del núcleo de la célula. La información genética se distribuye entre los cuarenta y seis cromosomas, un total de aproximadamente 6.400 millones de pares de bases de la secuencia de ADN, que juntos forman el genoma humano. Estos cromosomas son en realidad veintitrés pares de cromosomas

(diploide). Están numerados del 1 al 22, ordenados por tamaño decreciente (el cromosoma 1 es el más grande).

El vigésimo tercer par de cromosomas determina si una persona es biológicamente una mujer o un hombre y viene en dos versiones: un cromosoma X más grande y un cromosoma Y más pequeño que tienen genes diferentes.

Con algunas excepciones, las mujeres tienen dos cromosomas X en cada célula y los hombres tienen un cromosoma X y uno Y.

Los cromosomas dentro de cada par son en gran parte idénticos (con la excepción de los cromosomas X e Y), pero tienen desajustes ocasionales en la secuencia de pares de bases de ADN a lo largo de las hebras. Estos desajustes, también llamados variantes, son los que hacen que cada persona sea única.

Uno de los cromosomas de cada par se hereda de la madre de la persona y el otro cromosoma del padre.

Las variantes que provienen de la madre son las que hacen que una persona se parezca a la madre en todo tipo de características como apariencia, salud y riesgo de enfermedad. Asimismo, las variantes heredadas del padre crean similitud con el padre. Tener una mezcla de variantes de la madre y el padre convierte a la persona en un verdadero híbrido de los padres.

Debido al emparejamiento de cromosomas de esta manera, la mayoría de los genes del genoma están presentes en dos versiones, dos copias, una de la madre y otra del padre.

Mutación

Es un error particular en un gen que hace que la proteína que codifica cambie un aminoácido en una posición por otro, lo cual altera su función.

Código genético

Instrucciones contenidas en un gen que le dicen a la célula como hacer una proteína específica.

Proyecto Genoma Humano

Es un esfuerzo internacional encabezado por los Institutos Nacionales de Salud de EE. UU. Sus objetivos eran determinar las secuencias de pares de bases de ADN completas en los veintitrés pares de cromosomas e identificar y mapear con precisión las ubicaciones de todos los genes.

Lanzado en 1990, se declaró completo en 2003 habiendo identificado alrededor de veinte mil genes codificadores de proteínas en el genoma humano a un costo de alrededor de 3 mil millones de dólares.

El Dr. J. Craig Venter fundó la empresa Celera Genomics en 1998 con el objetivo de secuenciar el genoma humano como un esfuerzo privado paralelo al Proyecto Genoma Humano.

(El modelo comercial de esta fuente alternativa era vender el acceso a la base de datos de secuencias patentada de Celera a investigadores dispuestos a pagar miles de dólares estadounidenses en tarifas cada año. La competencia de Celera con el gobierno federal con miras a obtener ganancias era controvertida, pero debido a que los datos de secuencia eran tan útiles, los investigadores se valían del servicio de Celera para rastrear los datos y encontrar exactamente lo que necesitaban).

Revoluciones tecnológicas en Biología

- Década de 1980 1985 (K. Mullis). Reacción en cadena de la polimerasa, conocida como PCR (*polymerase chain reaction*).
- Década de 1990. Secuenciación de alto rendimiento del ADN.
- Década de 2000. Tecnología de edición de genes.