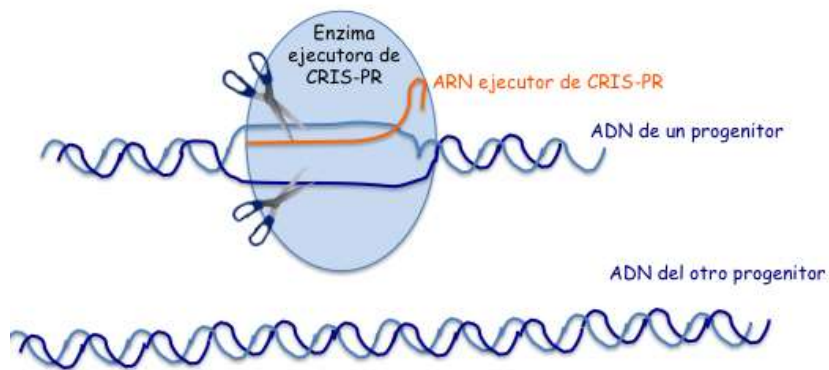


La nueva revolución de la manipulación genética se llama CRIS-PR



Modus operandi de CRIS-PR. El ARN ejecutor busca su ADN complementario y la enzima asociada ejecutora corta las dos hebras del ADN.

La técnica de manipulación genética denominada CRIS-PR plantea nuevos retos a la humanidad, mayores si cabe que los que en los inicios de la ingeniería genética llevaron a convocar la Conferencia de Asilomar en 1975.

Marta Izquierdo, Catedrática del Departamento de Biología Molecular, nos introduce en las bases de la técnica CRIS-PR y nos ilustra sobre sus aplicaciones

La molécula de ácido desoxirribonucleico, el ADN, es el soporte físico de la información genética y se comporta como si fuera una cuerda larga y flexible llena de instrucciones. El genoma es el conjunto de todas estas normas y explicaciones almacenadas en el ADN. El ARN es el mensajero que transporta fielmente las instrucciones depositadas en el ADN, hacia otras partes de la célula donde puedan ser correctamente interpretadas. Prácticamente todos los organismos, grandes o pequeños, formados de una sola célula o millones de ellas, utilizan este sistema universal de acumular, guardar y transmitir la información genética.

Las bacterias son muy cucas y cuando algún virus ha tratado de infectarlas sin éxito, se guardan un pequeño fragmento del ADN invasor en una especie de almacén inmunológico para que cuando lo intenten de nuevo, sean aniquilados rápidamente y sin piedad ¿Les suena familiar este

comportamiento? Sí, nuestro sistema inmune quizá haya tomado buena nota de lo que hacen las bacterias y a lo largo de millones de años de evolución, lo ha mejorado, diversificado, pulido y ampliado.

El almacén donde las bacterias guardan los pedacitos de virus vencidos, es también muy cuco y cada trocito de invasor esta custodiado, a derecha e izquierda, por otros cachitos de ADN, todos ellos idénticos, como fieles guardianes que custodian al enemigo. Este almacén inmunológico de las bacterias lo han llamado los primeros investigadores que lo han descrito "CRISPR" en alusión a las siglas en inglés de *clustered regularly interspaced short palindromic repeat* es decir lugar donde se encuentra un cúmulo de repeticiones cortas intercaladas. Aún no se sabía que los trocitos de ADN invasor era lo que separaba los cachitos de ADN idéntico.

Hoy sabemos que cuando un virus despistado vuelve a intentar infectar esta bacteria, el sistema CRIS-PR se encarga de producirle un corte mortal en su ADN, por ser idéntico al guardado en el almacén inmunológico, verdadera memoria de infecciones exitosas.

Este mecanismo que produce cortes mortales en ADNs invasores, ha servido de base para diseñar una estrategia paralela que ejecute un corte mortal en cualquier lugar de cualquier genoma animal o vegetal. El brazo ejecutivo de CRIS-PR es una proteína que corta (enzima) y un ARN que identifica por apareamiento, el ADN a cortar (ARN guía).

Cuando a una célula de cualquier tipo y condición, le llega un ARN guía y una enzima manostijeras, no augura buenas intenciones. El ARN guía que actúa como señuelo, buscará sin prisa ni pausa un ADN complementario para producirle un corte de mal cariz.

La célula agredida tiene dos alternativas para reparar el daño infringido. Un corte limpio en el ADN es una herida de gravedad porque las enzimas reparadoras, que las hay, no son nada eficientes en estas circunstancias. Al lugar del incidente se acercan unas proteínas que a duras penas remiendan el ADN roto introduciendo pequeñas alteraciones durante la reparación; una verdadera chapuza que constituye la primera alternativa celular de solucionar el incidente. El ADN del gen reparado ya está tocado y en adelante no podrá funcionar con normalidad. Pero la derrota de la célula puede ser considerada bastante dulce para el investigador ya que ha provocado una alteración (mutación) en un lugar concreto y específico del genoma, a voluntad. Esta es una de las grandes aplicaciones de la técnica CRIS-PR porque nos permite simular cualquier enfermedad de origen genético. Conociendo el gen que falla en un determinado mal, podemos mimetizar la dolencia provocando un corte vía CRIS-PR en el gen diana, y una vez que tenemos células afectadas, podremos probar nuevos fármacos o estrategias que permitan una posible curación.

También podemos introducir varias mutaciones simultáneamente en distintos lugares del genoma; para ello habrá que facilitar a la célula diversos ARN guías para que conduzcan a la enzima ejecutora a varios sitios diferentes donde cortará eficazmente. Algo muy valioso si se quieren emular células cancerosas por ejemplo, que suelen tener múltiples lugares alterados en su genoma.

Si utilizamos CRIS-PR en una célula huevo fecundada de un ratón, tendremos animales que lleven la mutación deseada en todas las células del organismo. Estos modelos animales de cualquier enfermedad genética, son de gran valor para probar terapias novedosas antes de pasar a pacientes humanos. Las técnicas que se utilizaban para estos fines con anterioridad eran bastante más costosas y menos eficientes.

Otra cosa que nos permite CRIS-PR es cortar en regiones del genoma que no sabemos su función y ver si la célula se resiente en algo concreto que podamos ver o medir. Teniendo en cuenta que no estamos muy seguros del trabajo que realiza un porcentaje muy elevado del genoma, la aplicación puede ser de gran interés en investigación básica, verdadero motor de la aplicada.

La segunda alternativa para reparar el daño provocado por las tijeras de CRIS-PR, es echar mano de una copia de ADN igual al vulnerado, que se encuentre en las proximidades. La mayoría de los animales, y por supuesto el ser humano, tenemos dos copias del genoma, una que recibimos de nuestro padre y otra de nuestra madre. Así, la célula con un corte de mala pinta en un lugar definido del ADN paterno puede optar por sustituir la zona cortada por una copia de la región intacta del ADN materno, algo que se llama recombinación homóloga y que la célula realiza bastante a menudo como mecanismo reparador. Claro, siempre que la maquinaria de reparación celular pueda actuar antes de que CRIS-PR corte tanto el cromosoma paterno como el materno. También podemos literalmente inundar la célula dañada por CRIS-PR con pequeños fragmentos de ADN normales. Los servicios de reparación usarán de buen grado estos trocitos accesibles para sustituir el área o áreas dañadas por sus equivalentes normales, usando el mecanismo de recombinación homóloga. Aquí se intuye otra de las grandes aplicaciones de CRIS-PR para curar genes dañados, y como consecuencia, curar cualquier enfermedad genética al sustituir las copias dañadas por otras sanas.

Las posibles aplicaciones de CRIS-PR no acaban aquí. Los investigadores pueden manipular las características de la enzima ejecutora

asociada a CRIS-PR, también llamada Cas (del inglés: CRISPR associated), y hacer que se siente plácidamente en la región que determine el ARN guía, pero sin cortar nada, simplemente impidiendo el acercamiento a este lugar de otras moléculas. Si estas otras moléculas pretendían activar un gen concreto, Cas sin tijeras lo está impidiendo. De esta manera podemos reprimir la expresión de genes. Algunos investigadores han manipulado Cas sustituyendo sus tijeras por agentes metilantes, acetilantes o que respondan a la luz. El ADN metilado se comporta de manera diferente al que no lo está, algo que pasa a ser controlado por el investigador pudiendo metilar a voluntad regiones concreta en el ADN. Las acetilaciones también modifican el modo de actuar del ADN y de nuevo pasan a ser controladas por el investigador que, dependiendo de los ARN guía que le facilite a una célula, va a decidir las regiones que se acetilarán en esa célula. Al acoplar Cas a proteínas que se activan con luz azul, por ejemplo, controlaremos el trabajo de Cas al iluminar las células con este tipo de luz.

Las alergias a los huevos de gallina, que sufren aproximadamente un 2% de los niños de todo el mundo, están causadas por una reacción contra una de cuatro proteínas de la clara del huevo. Utilizando CRIS-PR para cortar y eliminar estas 4 proteínas en algunas gallinas, éstas pondrían huevos hipoalérgicos aptos para niños con alergia a la clara del huevo.

De momento CRIS-PR se ha utilizado con éxito para manipular genomas de mosquitos, moscas, monos y embriones inviables humanos, entre otros.

Mosquitos que propagan un gen que esteriliza a las hembras han sido liberados para combatir la malaria. Especies que incuban el virus Zika podrían ser manipulados para eliminar o inactivar el genoma viral, aunque los efectos ambientales y ecológicos asociados son desconocidos.

Entre los proyectos innovadores está la manipulación del genoma de las abejas para impedir o retrasar su posible extinción, así como la producción de cerdos resistentes al virus de la peste porcina o vacas inmunes al tripanosoma de la enfermedad del sueño. No queda claro si la normativa existente en los distintos países contra animales o plantas manipuladas genéticamente, debería o no, ser aplicada a los individuos manipulados vía CRIS-PR, ya que estos últimos no contienen genes foráneos.

La ventaja de CRIS-PR frente a otras metodologías similares, es la precisión con la que se produce el efecto deseado y la disminución de posibles efectos secundarios incontrolados.

Esta nueva tecnología de manipulación genética permite, para bien y para mal, corregir cualquier información que resida en nuestros genes. Los parabienes están relacionados con la curación de numerosas enfermedades que a día de hoy no tienen fácil tratamiento, los paramales podrían

derivarse de un uso no controlado de esta potente herramienta de manipulación genética.

El año pasado, unos investigadores en California utilizaron CRIS-PR para dañar irremisiblemente las dos copias (paterna y materna) de un gen que controla la pigmentación en la mosca del vinagre (*Drosophila melanogaster*). La mosca pasó de tener una coloración marrón a amarillo chillón, color que heredaron sus descendientes y los de estos, y a su vez los siguientes etc. El cambio fue tan eficiente y poderoso, que de haberse escapado alguna de estas moscas rubiales, entre una y cinco de las *Drosophilas* que visitan regularmente nuestras bodegas, sería rubias a día de hoy. No se escapó ninguna mosquita rubia, pero algunos consideran que hay que controlar CRIS-PR porque puede ser un arma de destrucción masiva, y siempre es mejor prevenir que lamentar. De nuevo el debate está servido.