



## El sistema CRISPR-Cas y su aplicación en las enfermedades infecciosas

Orville Hernández Ruíz\*

Las enfermedades infecciosas siguen siendo una amenaza global, y contribuyen con una alta morbilidad, excesivas tasas de muertes anuales, y con un potencial riesgo latente de generar pandemias que afectan el equilibrio y la salud de las poblaciones. Una mejor comprensión de la fisio-patogenia de las infecciones por bacterias, virus, hongos y parásitos, junto con un rápido diagnóstico y tratamiento, son esenciales para disminuir las consecuencias de estas enfermedades.

Recientemente, se descubrió en los genomas de organismos procarióticos (bacterias y arqueas) unos *loci* genómicos denominados CRISPR (sigla en inglés para *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*; en español: repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas). Estas regiones generalmente se encuentran asociadas a un grupo de genes que codifican para proteínas con actividad nucleasa, *Cas*. El sistema CRISPR-Cas les proporciona a los procariotas una unidad de almacenamiento de memoria en la que se secuestran secuencias espaciadoras de ácido nucleico derivadas de elementos genéticos invasores como los virus, generando en ellos un mecanismo de inmunidad adaptativa. Posteriormente, estas secuencias son empleadas para guiar las proteínas Cas que se encargan de la eliminación dirigida de elementos genéticos extraños que ingresan a la célula. A la fecha se han descrito dos clases de sistemas CRISPR-Cas, que incluyen seis tipos y subtipos múltiples. Los sistemas de clase 1 CRISPR-Cas incluyen los tipos I, III y IV que utilizan una maquinaria de interferencia compuesta por múltiples proteínas Cas, mientras que los sistemas de clase 2, incluidos los tipos II, V y VI emplean una única proteína Cas para la interferencia.<sup>1</sup>

El sistema naturalmente ocurre en tres pasos básicos: en el primer paso ocurre la **adaptación**, donde

la célula reconoce el elemento genético extraño, selecciona en su genoma una secuencia específica denominada PAM (del inglés *protospacer adjacent motif*) y la corta para posteriormente integrarla en el cluster CRISPR presente en la célula procariota; este paso es generalmente mediado por *cas1* y *cas2*. En los diferentes sistemas CRISPR-Cas, los PAMs ayudan a reconocer el ADN propio diferenciándolo del ADN extraño, evitando así la autoinmunidad y la destrucción de su propia matriz CRISPR.<sup>2</sup> El segundo paso es la **maduración del ARN-CRISPR (ARNcr)**, en el que la generación del ARNcr maduro inicia con la transcripción de pre-ARNcr dentro de la secuencia líder que precede a la matriz CRISPR y da como resultado múltiples segmentos de repetición y espaciadores. Estos segmentos se dividen en crRNAs maduros individuales que guían a las proteínas Cas a su objetivo. Finalmente, el tercer paso es la **interferencia**; para el sistema CRISPR-Cas han sido descritos diferentes tipos de maquinarias de interferencia. La **maquinaria clase 1** consta de complejos multiprotéicos asociados principalmente a defensa antiviral, estos incluyen el reconocimiento del PAM en dianas extrañas; la unión del ARNcr al ADN diana es mediada por diversas proteínas Cas, lo que genera una fragmentación de este ADN extraño. Por su parte, la **maquinaria clase 2** emplea la Cas9 como única nucleasa en lugar de un complejo de proteínas. Esta maquinaria clase 2 es ampliamente utilizada en diversas aplicaciones de la tecnología CRISPR.<sup>3</sup>

La biotecnología CRISPR-Cas9 ahora se aplica ampliamente en múltiples disciplinas, incluidas la ingeniería del genoma humano, las ciencias médicas, las enfermedades infecciosas, las ciencias agrarias y biotecnológicas aplicadas al desarrollo y mejoramiento

\* Docente, Investigador, Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

de fármacos, entre otros. Adicionalmente, la tecnología CRISPR se ha aplicado como una estrategia para inducir en algunos microorganismos procariotas y eucariotas mutaciones genéticas puntuales en genes blanco, esto con el fin de evaluar su función e importancia en la biología de la célula mutada.

### APLICACIONES DEL SISTEMA CRISPR-Cas EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS

La edición de genes usando el sistema CRISPR-Cas9 se ha utilizado para comprender los mecanismos por los cuales las bacterias, virus, parásitos y hongos (estos últimos difíciles de manipular, debido a la baja eficiencia de edición del genoma) inducen enfermedades en humanos, lo que podría emplearse para guiar la atención clínica y diseñar racionalmente terapias dirigidas, además del desarrollo de vacunas o fármacos mucho más eficientes.

Esta tecnología revolucionaria ha contribuido a importantes avances en el desarrollo de métodos diagnósticos rápidos y precisos para enfermedades infecciosas. Adicionalmente, esta metodología usada en combinación con técnicas de amplificación basadas en la secuencia del ácido nucleico (NASBA) ha permitido distinguir con precisión cepas del virus Zika; combinada con mapeo óptico de ADN ha permitido identificar genes de resistencia a beta-lactamasas de espectro extendido (BLEE), carbapemasas (KPC) y metalo-lactamasa 1 de Nueva Delhi (NDM-1); y finalmente, CRISPR acoplada con hibridación *in situ* fluorescente (FISH) ha logrado detectar *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA).<sup>4</sup>

La plataforma CRISPR ha sido empleada, además, para el desarrollo de plataformas diagnósticas para enfermedades infecciosas. Una de estas plataformas se denomina “desbloqueo reportero enzimático específico de alta sensibilidad” (SHERLOCK), que combina la amplificación isotérmica de polimerasa recombinasa (RPA) o transcripción inversa (RT)-RPA con escisión de una proteína Cas. Usando esta plataforma, se ha logrado establecer diferencias entre cepas del virus Zika y cepas del virus del dengue; identificar *E. coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, y distinguir entre los aislamientos de *K. pneumoniae* con diferentes genes de resistencia (KPC y NDM). La característica que hace atractiva a

esta tecnología es su capacidad para discriminar cambios de nucleótidos individuales. Existen otras plataformas derivadas de CRISPR las cuales son, y muy probablemente serán, empleadas como herramientas diagnósticas útiles y oportunas para la identificación de microorganismos causantes de enfermedades infecciosas.<sup>5</sup>

### ¿POR QUÉ Y EN QUÉ USAR SISTEMAS CRISPR-CAS EN EL ESTUDIO DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS?

En el contexto de infecciones bacterianas humanas, el uso de antibióticos de amplio espectro, a menudo iniciado empíricamente, ejerce una presión para el desarrollo de microorganismos resistentes, por lo cual existe un evidente incremento en la resistencia a antibióticos. Considerando el papel del sistema CRISPR-Cas en las bacterias para prevenir la adquisición de elementos genómicos, podría emplearse este mismo sistema para estudiar cómo hacer que las propias defensas de las bacterias puedan aplicarse terapéuticamente contra ellas. Muchos estudios están siendo desarrollados buscando implementar este sistema para tal fin. Empleando este mismo principio, se ha propuesto que la tecnología CRISPR se pueda utilizar para desarrollar antimicrobianos selectivos que eliminen en bacterias patógenas elementos genéticos resistentes a los medicamentos y permitan la restauración de la susceptibilidad a los antibióticos mientras se mantiene la viabilidad bacteriana, siendo esto último muy importante, pues permite mantener el microbiota necesario para el hospedero.

Con relación a las infecciones virales, el sistema CRISPR se ha utilizado hasta ahora *in vitro* y en modelos animales, para reducir o eliminar las infecciones virales persistentes que incluyen entre otros los virus de la hepatitis, del herpes, del papiloma y del VIH; los resultados obtenidos generan nuevas esperanzas de curación para este tipo de enfermedades y otras de origen viral.<sup>6</sup>

La adecuada implementación de esta tecnología permitirá aclarar las relaciones hospedero-patógeno que tienen lugar en el desarrollo y consolidación de las enfermedades infecciosas; considerando lo anterior, se puede asegurar que en la medida que aparezcan nuevos conocimientos acerca de los principios y aplicaciones de la tecnología CRISPR-Cas, la utilidad en la clínica, la investigación, la industria y la agricultura, será cada

vez mayor. Además de lo anterior, y relacionado con el que hacer en el laboratorio, es de gran utilidad el desarrollo de pruebas diagnósticas precisas y portátiles basadas en CRISPR para el diagnóstico de enfermedades infecciosas. Estas plataformas requerirán de una apropiada validación y una cantidad suficiente de pruebas de campo que garanticen la sensibilidad, especificidad, oportunidad y precisión diagnóstica, lo cual redundará en beneficio de los pacientes y del sistema de salud.

Sin embargo, la posibilidad de manipular y editar genomas procariotas y eucariotas en manos poco éticas, podría convertirse en una amenaza para la humanidad. Hace parte entonces de esta nueva era y de quienes la habitamos y apreciamos el conocimiento, generar conciencia y tomar decisiones apropiadas para que estas herramientas vayan en consonancia con el progreso, el respeto a la vida y a las poblaciones humanas.

## REFERENCIAS

1. **Makarova KS, Wolf YI, Alkhnbashi OS, Costa F, Shah SA, Saunders SJ, et al.** An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Micro-biol.* 2015;13:722-736.
2. **Koonin EV, Makarova KS, Zhang F.** Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems. *Curr Opin Microbiol.* 2017;37:67-78.
3. **Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, et al.** CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science.* 2007;315:1709-1712.
4. **Gasiunas G, Barrangou R, Horvath P, Siksnys V.** Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proc Natl Acad Sci.* 2012;109:E2579-E2586.
5. **Müller V, Rajer F, Frykholm K, Nyberg LK, Quaderi S, Fritzsche J, et al.** Direct identification of antibiotic resistance genes on single plasmid molecules using CRISPR/Cas9 in combination with optical DNA mapping. *Sci Rep.* 2016;1;6:37938.
6. **Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Kellner MJ, Joung J, Collins JJ, Zhang F.** Multiplexed and portable nucleic acid detection platform with Cas13, Cas12a, and Csm6. *Science.* 2018;360(6387):439-444.
7. **Hu W, Kaminski R, Yang F, Zhang Y, Cosentino L, Li F, et al.** RNA-directed gene editing specifically eradicates latent and prevents new HIV-1 infection. *Proc Natl Acad Sci.* 2014;111(31):11461-6.