

CRISPR-CAS9 en medicina, la saga continúa

Hace solo dos años fuimos testigos de la impactante noticia que anunciaba la corrección del gen anómalo de la enfermedad hereditaria miocardiopatía hipertrófica en embriones humanos por medio de la técnica CRISPR/CAS9^{1, 2}. Esta noticia movilizó la opinión científica y pública porque era el comienzo de la edición de embriones humanos. En ese momento se plantearon dudas éticas y de validación científica.

Pasados dos años algunos de nuestros miedos cobraron vida. En noviembre del 2018, el biólogo chino He Jianku anunció el nacimiento de las primeras niñas genéticamente modificadas, en las que por medio de las tijeras moleculares CRISPR/CAS9 se había introducido la mutación *CCR5Δ32* que las haría resistentes a la infección con HIV. El "experimento" fue ampliamente condenado, ya que no se obtuvo ningún permiso para realizarlo. Posteriormente, investigadores propusieron que esta mutación estaría asociada a un mayor riesgo de muerte en la adultez, y otros, que les conferiría mayores capacidades neurocognitivas.

En Rusia se está planteando un experimento similar para tratar una pareja con sordera hereditaria causada por una mutación en el gen *GJB2*. Según las noticias, la mujer ya está cosechando sus óvulos, a los cuales se les secuenciará el genoma y luego se presentará la solicitud al Ministerio. No se entiende bien porqué la solicitud no es anterior y qué opinan los Comités de Ética del país.

Pero también, y en exceso, son buenas y prometedoras las perspectivas que ofrece la tecnología. Numerosos ensayos clínicos se están llevando a cabo con CRISPR-CAS9 (50% en China y 35% en EE.UU.). Como regla general, los investigadores saben que antes de pasar al uso en humanos se deben realizar los ensayos clínicos y que la aprobación de un Comité de Ética es insoslayable. La mayoría de los ensayos clínicos aprobados hasta el momento solo incluyen estudios de seguridad, desarrollos diagnósticos, o tratamientos *ex vivo*. Es decir, las células de pacientes con cáncer o enfermedades genéticas serán extraídas, y editadas *in vitro* por la técnica de CRISPR-CAS9 para conferirles resistencia al cáncer o reparación de la mutación. Luego, las células serán re infundidas a los pacientes. Hay ensayos para talasemia, anemia falciforme, distrofia muscular de Duchenne, HIV, tumores sólidos, leucemia, HPV y distintos tipos de cáncer. Por el momento son ensayos preliminares y destinados a comprobar la seguridad de los tratamientos.

Un ensayo para destacar es el tratamiento *in vivo* para la amaurosis congénita de Leber, una forma común de ceguera hereditaria en la niñez. Sería el primer ensayo en que los científicos intentan usar CRISPR para editar genes directamente dentro del cuerpo humano. El sistema ocular está contenido y protegido por la barrera hematoencefálica, por lo cual se infiere que la terapia quedaría localizada en el ojo. La FDA de EE.UU. ya ha dado la luz verde para este ensayo clínico. Se corregirá la mutación *IVS26* mediante dos guías de moléculas de ARN, y un *Staphylococcus aureus* que contiene la secuencia de CAS9, bajo el control del promotor de la quinasa de rodopsina, específica de células fotorreceptoras. La enzima guiada al sitio de mutación por las guías de ARN cortará el ADN defectuoso y por recombinación no homóloga se reparará el corte.

No hay ensayos clínicos aprobados para editar embriones humanos.

En nuestro país hay numerosos y destacados científicos trabajando con esta tecnología. Muchos ya la usan de rutina para sus estudios de ciencia básica. Pero también la Argentina incursiona en la medicina traslacional⁹. Son estudios multidisciplinarios que incluyen biólogos moleculares, bioinformáticos, médicos, biotecnólogos e incluso empresarios. En general los estudios encaran desarrollos diagnósticos y de búsqueda de biomarcadores para enfermedades. De interés, una *Start Up* de CONICET (CASPR) estudia el sistema CRISPR CAS12, que propone una alternativa interesante. La CAS12 una vez que reconoce y corta el *target* específico, desencadena una actividad colateral endonucleasa inespecífica que corta una secuencia con fluoróforo que está quencheda, proporcionando un semáforo de presencia de la mutación, virus o bacterias *target*. Con este sistema se ha logrado detectar bacterias super resistentes en el orden atomolar (2 moléculas por ml) en menos de 30 minutos y con bajo costo.

Actualmente se está desarrollando la portabilidad de un *kit* para detectar dengue, zika o hantavirus por medio de una tira reactiva que podrá ser usada en el medio del campo o en los lugares que lo precisen en el interior del país, con costos 70 veces inferiores a una PCR convencional. Se propone además digitalizar la información que se podría leer con una aplicación del celular.

Este grupo está también en la búsqueda de clonar una CAS argentina, para no tener que recurrir a las patentes internacionales. Y está buscando en bacterias de la Antártida, Tucumán, Catamarca y Misiones.

Otras aplicaciones de CRISPR-Cas9 en el país involucran una plataforma de análisis genéticos, buscando nuevos blancos terapéuticos para cáncer de mama triple negativos, o para cáncer de mama que desarrolla resistencia a la hormona terapia. Usando esta tecnología están desarrollando un cribado de marcadores a nivel genómico. En este estudio trabajan investigadores del CONICET, de la UBA, Glaxo Smith Kline, y son financiados en parte por la Agencia de Promoción Científica y Tecnológica de la Secretaría de Ciencia y Tecnología del país.

Somos testigos además de la segunda generación del sistema CRISPR-CAS que no solo corta en forma específica, sino que quitando a la proteína CAS su propiedad de tijera, se ha logrado agregarle distintas funciones, como la activación o represión de genes, o la modificación de la regulación epigenética por histonas.

Como agente terapéutico el panorama presenta aún muchos desafíos. En primer lugar, años de estudio de la genética y epigenética nos alertan que un gen tiene más de una función y participa en red con muchos otros. Por lo tanto es importante definir qué acciones colaterales puede tener su delección. En segundo lugar, es necesario mejorar la certeza de los cortes por la CAS9, para que no haya *off-targets* o cortes no deseados con consecuencias imprevisibles. Además, se está trabajando intensamente en el *delivery* del sistema, para que el sistema llegue principalmente al órgano deseado, y el tamaño sea compacto. Se proponen esquemas de microinyección, electroporación, modificaciones para que se pegue a una determinada proteína de membrana, nanotecnología, etc. También recientemente, se ha conocido que podemos tener anticuerpos anti CAS9, por infecciones virales anteriores, por lo que se está trabajando en bajar la inmunogenicidad de los compuestos.

Finalmente, los costos de los supuestos tratamientos se calculan en más de 200 000 dólares, por lo cual todavía hay una responsabilidad social para bajar los costos.

Frente al gran avance de la tecnología no podemos quedarnos paralizados. No se puede volver atrás. Es nuestra responsabilidad evitar maniqueísmos o posiciones binarias. En primer lugar, los médicos e investigadores debemos estar bien informados de los alcances de las técnicas. También debemos ser respetuosos de los que tienen ideas diferentes. Nuestra obligación siempre ha sido brindar lo mejor para nuestra descendencia. Siempre lo hemos hecho, adoptando vacunas, antibióticos, alimentación, educación. Pero no hay una línea clara entre prevenir y mejorar, y la línea será distinta para distintos grupos. Si las ediciones genéticas pasan a la descendencia tenemos una responsabilidad social. Por un lado, el costo excesivo de la tecnología determinará su uso por grupos socio-económicos privilegiados, esto podría ampliar la desigualdad social. Y pasaríamos a tener grupos cuyo lujo sea no solamente los autos de alta gama, sino sus genes. El deseo de mejorar de las personas es ilimitado, y si los tratamientos pasan a tener una cobertura médica pública también el sistema podría colapsar.

Una regulación deficiente puede dar lugar a “cowboys” científicos como He. Y también a usos fraudulentos, como en el caso de las células madres, o el tan conocido caso de la crotoxina. Pero confiamos en los Comités de Ética, en las Academias Científicas. Y sobre todo confiamos en el ser humano, que en su gran mayoría quiere lo mejor para la sociedad, y para su descendencia.

Damasia Becú-Villalobos

Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME-CONICET), Buenos Aires, Argentina

e-mail: dbecu@dna.uba.ar

1. Becú-Villalobos D. El Sistema Crispr/Cas9 ¿Cambiará el genoma de la humanidad? *Medicina (B Aires)* 2018; 77: 521-3.
2. Ma H, Marti-Gutierrez N, Park SW, et al. Correction of a pathogenic gene mutation in human embryos. *Nature* 2018; 548: 413-9.
3. Becú-Villalobos D. Medicina traslacional, ¿moda o necesidad? *Medicina (B Aires)* 2014; 74: 170-2.