

Sal mediterránea, yogur, genética e inmunoterapia

La historia de una herramienta molecular que ha llegado a ser utilizada en el tratamiento de leucemias y linfomas, nos envía en la máquina del tiempo, 25 años atrás, a la Costa Blanca de España para devolvemos en 2018 a la realidad de una nueva opción para el tratamiento de las malignidades hematológicas.

La historia nació en 1993 con el investigador español Francisco Mojica, quien entonces estudiaba los efectos de la salinidad sobre las enzimas de restricción que cortaban el genoma de *Haloferox mediterranei*. Mojica encontró algo no descrito: copias múltiples de secuencias palindrómicas de bases nitrogenadas en el ADN de *H. mediterranei*, y en otros organismos que estudió siguiendo la línea de investigación de su hallazgo, nombrado “Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats” (CRISPR). La explosión de conocimiento sobre CRISPR permitió que en pocos años aumentara en forma exponencial el número de microorganismos en lo que se demostró la presencia del descubrimiento y se generó un sistema de clasificación en 2 clases y 5 tipos, lo mismo que la identificación de genes adyacentes con funciones relacionadas. Sin embargo, hasta 2002 era un descubrimiento interesante, una curiosidad apasionante, prometedora, generadora de investigación, pero sin una aplicación definida.

La primera evidencia de por qué era un mecanismo común en bacterias, se determinó al establecer la relación entre secuencias de CRISPR y virus, plásmidos y bacteriófagos, lo cual creó la evidencia de que se trataba de la codificación de un sistema de defensa adquirido, que protegía los microorganismos de infecciones específicas, un nuevo componente del sistema inmune. La función como componente del sistema inmune fue también demostrada en *Yersinia pestis* y se conceptuó que se trataba de un sistema de defensa antibacteriófagos a nivel bacteriano.

La primera utilidad práctica de CRISPR, fuera de su función en el sistema inmune de diferentes microorganismos, se advirtió con los estudios de Philippe Hovath en la industria del yogur en Francia. A este investigador se le encargó trabajar el problema recurrente de infección por bacteriófagos en *Streptococcus thermophilus*, que afectaba los cultivos necesarios para la preparación de quesos y yogur. En 2004, Hovath había identificado claramente la relación entre CRISPR y resistencia a la infección por bacteriófagos, demostrando que las cepas resistentes habían adquirido secuencias derivadas de los bacteriófagos en el *loci* CRISPR, demostrando un mecanismo de inmunidad adquirida. Además, fue evidente que los genes involucrados codificaban por proteínas con capacidad de cortar ácidos nucleicos, fundamentales como mecanismo de defensa contra bacteriófagos en el sistema de defensa bacteriano.

Pero ¿cómo conectamos desde bacterias, bacteriófagos, queso, yogur e inmunidad bacteriana, hasta elementos relevantes de la aplicación en enfermedades malignas del ser humano? La respuesta a esta pregunta comienza a aparecer cuando se demuestra que CRISPR tiene como blanco de su actividad, los ácidos nucleicos del ADN, y que se podía considerar como una enzima de restricción programable, la cual permitiría la edición genética fuera del contexto bacteriano, cortando y corrigiendo *loci* genómicos en células eucariotas. La siguiente pieza de investigación para el uso práctico actual de CRISPR, se agregó con la demostración de que la actividad de la nucleasa Cas9 corta el ADN en posiciones precisas codificadas por CRISPR, utilizando secuencias específicas complementarias de ARN.

Esta secuencia de eventos hizo eficiente el proceso de alterar genomas de mamíferos en células vivas, con CRISPR como enzima de restricción programable.

CRISPR es entonces una tijera de ADN, un editor de ADN, que funciona usando Cas9 como una nucleasa (la enzima cortadora de ADN), produciendo una enorme cantidad de aplicaciones en todos aquellos entornos donde esté envuelto ADN. Se podrían corregir defectos en genes, o bien, usar la herramienta en la construcción de insumos tecnológicos derivados de ADN. Además, es una herramienta que democratiza el uso de edición genética, haciéndolo accesible a cualquier laboratorio de biología molecular.

El uso de CRISPR ha permitido, en condiciones de laboratorio, desarrollar mosquitos con genes que evitan que sean vectores de malaria, o que producen infertilidad en las hembras, con lo cual se abre la posibilidad de su uso en el control de plagas y en la creación de plantas y animales genéticamente diseñados.

Se han desarrollado versiones de CRISPR que inhabilitan Cas9, con lo cual se elimina el efecto nucleasa, pero se preserva su habilidad de encontrar secuencias específicas de ADN, lo que permite convertir la herramienta en un eficiente vehículo de entregas (factores de regulación que prenden o apagan cualquier gen).

El cambio de propósito del sistema CRISPR, de su función original como mecanismo de defensa adquirido en bacterias para reconocer y destruir ADN de virus y plásmidos, a un eficiente editor de ADN, permitió el desarrollo de la ingeniería del genoma. También fue posible entender cómo trabaja Cas9, la nucleasa asociada a CRISPR, que es guiada a la secuencia blanco de ADN por un complejo de dos moléculas pequeñas de ARN: CRISPR ARN (crARN) y CRISPR ARN transactivador (tracrARN), la primera como pieza complementaria de un fragmento de ADN de un virus o un plásmido. La ingeniería de genoma basada en el uso del complejo CRISPR-Cas9-crARN-tracrARN, ha posibilitado con más facilidad crear modelos animales de mutaciones que causan cáncer, producir librerías a escala genómica de genes que participan en la generación de cáncer, o bien, que se relacionan con resistencia a drogas. Además, es una importante herramienta para plantear tratamientos contra el cáncer dirigidos a un blanco específico o a un *locus* predeterminado, o idear modificaciones en una secuencia genética que permitan corregir susceptibilidad al cáncer.

Otra aplicación que resulta muy interesante mencionar es el uso en terapia génica, en donde hay estudios que demuestran efectividad mutando VIH-1 para disminuir su expresión en células T humanas, o aplicándolo con potencial terapéutico en el combate de infecciones por virus de hepatitis B y papiloma humano.

Estudios en animales han demostrado que es posible, con el uso de CRISPR-Cas9 como vehículo, corregir mutaciones en genes que producen distrofia muscular de Duchenne y β -talasemias.

Sin embargo, un área realmente prometedora de aplicación de CRISPR como editor genético, con evidencia clínica y productos licenciados para uso humano, es la de la inmunoterapia, utilizando “linfocitos T con receptores antigénicos quiméricos” (“CAR T-cells”). Estos linfocitos T autólogos genéticamente modificados, expresan un receptor quimérico contra CD19, el panantígeno de los linfocitos B. La ingeniería de genoma basada en CRISPR-Cas9, permite construir un gen que se transfiere a linfocitos T autólogos usando un lentivirus como vector, y que codifica para la expresión de un complejo que contiene

un anticuerpo específico, la cadena ζ del receptor de la célula T y un componente coestimulador, todo lo cual produce una clona con memoria inmunológica que identifica y destruye por citotoxicidad las células malignas que expresen CD19. Estudios clínicos recientes han demostrado la eficacia de un tipo de CAR T, CTL019, dirigido contra CD19, en el tratamiento de leucemia linfocítica aguda y de linfomas, y que se percibe como el tratamiento moderno para las malignidades hematológicas. La aplicación clínica de este tipo de inmunoterapia nos enfrenta también a nuevos retos clínicos asociados a su uso, como son el síndrome de liberación de citoquinas y la restitución con inmunoglobulina intravenosa por la agammaglobulinemia secundaria a la eliminación de los linfocitos B.

La investigación científica avanzó mucho el conocimiento desde las bacterias en las arenas del Mediterráneo, pasando por la industria del yogur y el queso en Francia, hasta llegar a conformar CRISPR-Cas9 como una herramienta de gran potencial para la ingeniería del genoma, que muestra con base en la evidencia clínica, su utilidad en las aplicaciones de la inmunoterapia como tratamiento del cáncer.

Dr. Oscar Porras Madrigal (PhD)
Servicio de Inmunología y Reumatología Pediátrica
Hospital Nacional de Niños “Dr. Carlos Sáenz Herrera”
✉ oporrascr@gmail.com

Lecturas recomendadas:

1. Mojica FJM, Ferrer C, Juez G, Rodríguez-Valera F. Long stretches of short tandem repeats are present in the largest replicons of the Archaea *Haloflex mediterranei* and *Haloflex volcanii* and could be involved in replicon partitioning. *Mol Microbiol.* 2000; 36:244-246.
2. Mojica FJM, Díez-Villaseñor C, García-Martínez J, Soria E. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *J Mol Evol.* 2005; 60:174-182.
3. Lander ES. The heroes of CRISPR. *Cell.* 2016; 164:18-28.
4. Moses C, García-Bloj B, Harvey AR, Blancafot P. Hallmarks of cancer: the CRISPR generation. *Eur J Cancer.* 2018; 93:10-18.
5. Maude SL, Frey N, Shaw PA, Aplenc R, Barrett DM, Bunin NJ, *et al.* Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia. *N Engl J Med.* 2014; 371:1507-1517.
6. Schuster SJ, Svoboda J, Chong EA, Nasta SD, Mato AR, Anak O, *et al.* Chimeric antigen receptor T cells in refractory B-cell lymphomas. *N Engl J Med.* 2017; 377:2545-2554.
7. Thurtle-Schmidt DM, Lo TW. Molecular biology at the cutting edge: a review on CRISPR/CAS9 gene editing for undergraduates. *Biochem Mol Biol Educ.* 2018; doi: 10.1002/bmb.21108.
8. Chaudhary K, Chattopadhyay A, Pratap D. The evolution of CRISPR/Cas9 and their cousins: hope or hype?. *Biotechnol Lett.* 2018; doi: 10.1007/s10529-018-2506-7.
9. Maus MV, Levine BL. Chimeric antigen receptor T-cell therapy for the community oncologist. *Oncologist.* 2016; 21:608-617.
10. Fitzgerald JC, Weiss SL, Maude SL, Barrett DM, Lacey SF, Melenhorst JJ, *et al.* Cytokine release syndrome after chimeric antigen receptor T cell therapy for acute lymphoblastic leukemia. *Crit Care Med.* 2017; 45:e124-e131.