



**RED POR UNA AMERICA LATINA  
LIBRE DE TRANSGENICOS**

## **BOLETÍN N° 827**

### **PROBLEMAS DETECTADOS CON TECNOLOGÍA DE EDICIÓN DE GENES**

*Un nuevo estudio en ratones documenta frecuentes repeticiones indeseables de inserciones de ADN que no se detectan mediante análisis de PCR estándar.*

Katarina Zimmer  
Febrero 19, 2020

En menos de un decenio desde la adaptación de la técnica de edición del genoma llamada CRISPR-Cas9, esta se ha utilizado en animales y células de laboratorio en varios países del mundo, y se está probando en ensayos clínicos células humanas, para tratar enfermedades. Quienes han usado CRISPR reconocen ampliamente sus limitaciones (como la edición fuera de objetivo), y trabajan para reducirlas.

Añadiendo a la lista de problemas que pueden ocurrir con CRISPR, un equipo de investigadores ahora reporta una alta frecuencia de duplicaciones no deseadas encontradas en inserciones genéticas en ratones. Preocupantemente para los científicos, las inserciones no pudieron ser detectadas usando el análisis estándar de PCR (1). Los hallazgos fueron publicados el 12 de febrero en Science Advances.

Este artículo da una nueva advertencia sobre el uso de la edición genética basada en el CRISPR-Cas9 con fines de sustituir genes en ratones (knock-in), comenta el biólogo molecular de la Universidad de Nottingham Ed Bolt, que no participó en el estudio.

La investigación comenzó cuando la investigadora en inmunología Johannes Roth y sus colegas de la Universidad de Münster en Alemania estaban investigando la función de un gen (S100A8) que codifica una proteína de unión al calcio, en células inmunes de ratones transgénicos.

Sorprendentemente, encontraron que 30 de casi 50 animales, tenían múltiples copias de la construcción insertada, en lugar de una sola.

Los investigadores sustituyeron el gen S100A8 original, por una construcción en la que el gen está flanqueado por secuencias específicas que dirigen una enzima particular para excitar el gen. Esto conducirá a una eliminación del gen en



determinados tejidos, una vez que estos ratones se crucen con otros animales transgénicos que expresen la enzima sólo en los tejidos de interés.

Los investigadores inyectaron la construcción en los ovocitos fertilizados de los ratones, junto con la enzima Cas9 de corte de ADN y su guía CRISPR. En las 34 crías resultantes editadas con el gen, realizaron un análisis PCR estándar y otra forma más especializada de PCR, para comprobar si la construcción se había insertado correctamente. Para su sorpresa, los resultados sugirieron que sólo dos de las crías, parecían ser portadores de la inserción correcta; el resto portaban eliminaciones del gen o tenían genomas inalterados.

Los investigadores entonces usaron la técnica de cuantificación de copias de secuencias de ADN llamada "hibridación Southern blot", y confirmaron que había duplicaciones, tanto en los ratones parentales como en su descendencia. En general, los investigadores encontraron duplicaciones en nueve de diez grupos de ratones con diferentes inserciones de ingeniería. Y en casi 150 ratones bebés, criados a partir de cruces de animales transgénicos y no transgénicos, el 57% tenían múltiples copias.

La mayoría de los investigadores experimentados en el campo son probablemente conscientes de este problema, dice Katharina Boroviak del Instituto Sanger.

Sin el uso de técnicas adecuadas para detectar tales duplicaciones, los investigadores tal vez no se den cuenta de que hay mutaciones no deseadas en el genoma de sus organismos manipulados, señalan Skryabin y su colega Timofey Rozhdestvensky, especialista en ratones transgénicos. Estos ratones diseñados en laboratorio, podrían tener duplicaciones en su ADN que podrían causar que las proteínas sean efectivamente eliminadas en todos los tejidos o producir otros efectos adversos.

Skryabin y Rozhdestvensky escribieron un correo electrónico a The Scientist, que sus hallazgos podrían ser relevantes para la edición de genes en todos los reinos de la vida, desde las plantas hasta las células humanas. Las duplicaciones podrían, de alguna manera ,conducir a mutaciones peligrosas, resultando en proteínas deformadas, o causar serios efectos indeseados en la terapia genética humana.

Los autores recomiendan que los investigadores que diseñen cualquier inserción genética con CRISPR investiguen si los genomas fueron editados correctamente usando formas especializadas de análisis PCR, Southern blots, o nuevos métodos de secuenciación de genomas completos, que sean capaces de analizar secuencias repetitivas, para investigar si los genomas fueron editados correctamente.

Katharina Boroviak, una ingeniera de genoma del Instituto Sanger en el Reino Unido, que no participó en esta nueva investigación, no está sorprendida por los hallazgos. Ella también ha observado duplicaciones de secuencias insertadas en su laboratorio mientras generaba modelos de ratones transgénicos. La mayoría de los investigadores que han trabajado en esta área están, probablemente, conscientes de este problema.

Aunque muchos laboratorios toman las medidas de garantía de calidad apropiadas, es bueno que alguien haya publicado sobre ello, dice Boroviak. Ella añade que todo el mundo sigue hablando de lo genial y fácil que es CRISPR, pero si empiezas a



profundizar en los detalles... puedes ver qué es lo que realmente va mal y con qué frecuencia lo hace... Y es más frecuente de lo que se piensa.

Para Bolt, los hallazgos subrayan la necesidad de entender mejor los procesos de reparación del ADN. Aunque se piensa que la superficie CRISPR-Cas9 es una simple herramienta de edición de genoma, esta se basa en la reparación del ADN que es un proceso que es "horriblemente complejo", dice.

Los investigadores no tienen una buena comprensión de cómo funciona ese proceso, ni de cómo eso podría conducir a duplicaciones no deseadas, dice Bolt, que se especializa en la inestabilidad del genoma. Eso será crucial para entender si los investigadores quieren encontrar maneras de evitar el problema y mejorar la precisión de la edición de CRISPR-Cas9, algo en lo que Rozhdestvensky y Skryabin están trabajando ahora.

"Tenemos que tener claro que CRISPR-Cas9 es un método realmente poderoso para la eliminación de genes y para la comprensión de la biología", dice Bolt. Pero estamos muy lejos de entender cómo CRISPR-Cas9 puede ser usado para insertar ADN en Knock-in (2).

El artículo en inglés puede encontrarse en B.V. Skryabin et al., "Pervasive head-to-tail insertions of DNA templates mask desired CRISPR-Cas9-mediated genome editing events," *Science Advances* doi:10.1126/sciadv.aax2941, 2020.

Katarina Zimmer es una periodista free lance  
Twitter @katarinazimmer.

Notas:

- (1) PCR es una tecnología que permite con una probabilidad muy alta, secuencias génicas y determinar su origen
- (2) Knock-in. En clonación molecular y biología, un Knock-in se refiere a un método de ingeniería genética que involucra la introducción de un cDNA en un locus particular del cromosoma del organismo. Un ratón knock-in es aquel al que se le ha sustituido una secuencia génica por otra diferente o modificada.