



Aplicación de la nanobiotecnología con el sistema CRISPR-cas

Application of the nanobiotechnology with the system CRISP-Cas

Liceth Xiomara Sáenz-Castiblanco¹ orcid.org/0000-0003-2839-063X

Maritza Angarita-Merchán¹ orcid.org/0000-0002-0220-2701

Diana Paola López-Velandia^{1*} orcid.org/0000-0002-5408-6140

¹ Grupo de Investigación Bacteriología y Laboratorio Clínico, Universidad de Boyacá. Tunja, Colombia

Fecha de recepción: Noviembre 28 - 2016 Fecha de revisión: Septiembre 4 - 2017 Fecha de aceptación: Diciembre 1 - 2017

Sáenz Castiblanco LX, Angarita-Merchán M, López-Velandia DP. Aplicación de la nanobiotecnología con el sistema CRISPR-cas. Univ. Salud. 2017;19(3):400-409. DOI: <http://dx.doi.org/10.22267/rus.171903.102>

Resumen

Introducción: La nanobiotecnología y la biología sintética son ciencias que impactan en la actualidad con el lanzamiento de aplicaciones innovadoras y beneficiosas para el ser humano, estas ciencias se han fusionado para fabricar nuevos componentes para la construcción de células totalmente artificiales y la creación de biomoléculas sintéticas. **Objetivo:** Conocer las aplicaciones de la nanobiotecnología relacionadas con el uso del sistema CRISPR/Cas en el almacenamiento de información en el ADN bacteriano y alternativas terapéuticas. **Materiales y métodos:** Se realizó una revisión bibliográfica sobre las principales aplicaciones de la nanobiotecnología, en las bases de datos ScienceDirect, SciELO, PubMed y en revistas como: Nature biotechnology, Biochemistry, Science y Journal Microbiology. **Resultados:** La revisión de literatura describe y analiza las nuevas aplicaciones nanobiotecnológicas utilizadas para escribir información en el código genético de las células bacterianas, en el que se emplean el sistema basado en repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas (CRISPR/Cas) y la producción de ADN sintético, así como las alternativas terapéuticas relacionadas con la terapia génica. **Conclusión:** Entre las aplicaciones nanobiotecnológicas se han demostrado dos métodos para grabar información en el ADN de células bacterianas, de *Escherichia coli* y *Sulfolobus tokodai* vinculados con el empleo del sistema CRISPR/Cas y la producción de ADN sintético, así como el uso del CRISPR/Cas en la terapia génica y celular.

Palabras clave: Biotecnología; ADN recombinante; proteínas asociadas a CRISPR; memoria inmunológica; ingeniería genética. (Fuente: DeCS, Bireme).

Abstract

Introduction: Nanobiotechnology and synthetic biology are sciences that impact today with the launching of innovative and beneficial applications for the human being. These sciences have been amalgamated to manufacture new components for the construction of totally artificial cells and the creation of synthetic biomolecules. **Objective:** To know the applications of nanobiotechnology related to the use of the system CRISPR/Cas in the storage of bacterial DNA and therapeutic alternatives. **Materials and methods:** A bibliographical review on the main applications of nanobiotechnology was carried out in ScienceDirect, SciELO, PubMed databases and in magazines such as: Nature Biotechnology, Biochemistry, Science and Journal Microbiology. **Results:** The literature review describes and analyzes the new nanobiotechnology applications used to write information in the genetic code of bacterial cells, in which the system is used based on short grouped and regularly interspaced palindromic repetitions (CRISPR/Cas) and the production of synthetic DNA, as well as therapeutic alternatives related to gene therapy. **Conclusion:** Among the nanobiotechnology applications, two methods to record information in the DNA of bacterial

*Autor de correspondencia

Diana Paola López-Velandia
e-mail: dplopez@uniboyaca.edu.co

cells *Escherichia coli* and *Sulfolobus Tokodai* have been shown, which are linked to the use of the system CRISPR/Cas and the production of synthetic DNA, as well as the use of CRISPR/Cas in gene and cellular therapy.

Keywords: Biotechnology; DNA, recombinant; CRISPR-associated proteins; immunologic memory; genetic engineering. (Source: DeCS, Bireme).

Introducción

La ciencia ha ido evolucionando desde siglos atrás, realizando investigaciones centradas en la búsqueda de métodos innovadores que aporten al desarrollo de nuevas herramientas de diagnóstico y tratamiento de patologías, siendo la nanobiotecnología uno de los campos que despierta mayor interés en la investigación en el siglo XXI. Esta es una ciencia que ha generado gran impacto por ser una herramienta utilizada para la identificación de nuevas tendencias de innovación como aporte al desarrollo de la nanomedicina, ofreciendo soluciones en el diagnóstico, prevención, y tratamiento de enfermedades; en ingeniería genética, ha permitido la implementación de nuevos métodos para guardar información portátil en el ADN de microorganismos vivos⁽¹⁾.

La ingeniería genética permite la transferencia programada de genes entre distintos organismos para fabricar nuevos componentes, la construcción de células eucariotas y/o procariotas totalmente artificiales y la creación de biomoléculas sintéticas⁽²⁾. La introducción de la tecnología del ADN recombinante ha producido un cambio significativo en este campo de experimentación, puesto que permite clonar, diseñar y sintetizar nuevos genes que pueden introducirse en un organismo para conseguir la expresión de los mismos⁽³⁾.

La nanotecnología (deriva del griego *nânos* que significa enano) se define como el control de la materia a escalas entre 1 y 100 nanómetros⁽⁴⁾, el término fue acuñado en 1974 por el japonés Taniguchi Norio y sin embargo, fue Richard Feynman (premio Nobel de Física en 1965) con su famosa conferencia titulada "*Hay mucho espacio en el fondo*", quién sentó las bases para el desarrollo de la nanotecnología, con la idea de fabricar objetos "*átomo por átomo*", recalando

las leyes de la mecánica cuántica, que no excluían la posibilidad de construir máquinas del tamaño de moléculas^(5,6).

Se estima que la conferencia de Feynman, definió los referentes teóricos de lo que en la actualidad la comunidad científica internacional cataloga como uno de los proyectos más innovadores y ambiciosos de la ciencia moderna⁽⁷⁾. Las ideas de Feynman, no tuvieron gran repercusión hasta al menos dos décadas después, cuando otro investigador destacado Eric Drexler, a comienzos de la década de los 80, insinuó la posibilidad de crear sistemas tecnológicos con biología molecular⁽⁵⁾. En 1986, Drexler publicó el libro "*Los motores de la creación*", en el que vislumbró el futuro de lo que se conoce como nanotecnología molecular. En Japón en 1991 Sumio Iijima inició el desarrollo de una amplia gama de microscopios de sonda de barrido que lograron imágenes a escala atómica sumado al descubrimiento de los nanotubos de carbono (NTC), nanobiosensores de excelentes propiedades mecánicas y eléctricas^(8,9).

La revolución nanotecnológica abarca distintas ciencias, entre ellas: física, química, ingeniería y biología; contempla conceptos nuevos con un compendio de técnicas que se desarrollaron en los últimos 30 años y que constituyen la base experimental de la genética molecular y de la bioquímica⁽⁹⁾. La creación de uno de los primeros sistemas nano biotecnológicos fue la producción de proteínas y la tecnología del ADN recombinante, que puede ser aplicada en la maquinaria ribosomal de las células vivas para producir y diseñar proteínas tanto *In vivo* como *In vitro* para diferentes objetivos, que van desde la elaboración de tratamientos específicos para patologías como el cáncer, hasta la modificación genética de organismos con importancia económica (transgénicos)⁽¹⁰⁾. Además de esto, la nanobiotecnología se ha revelado con los nuevos sistemas que la ingeniería genética y la biología

sintética han desarrollado, generando métodos que permiten escribir información en el código genético de las células bacterianas haciendo uso de sus mecanismos de defensa, como el sistema de agrupaciones de repeticiones cortas palindrómicas regularmente interespaciadas/proteínas asociadas a CRISPR (CRISPR/Cas) y la creación de ADN sintético⁽³⁾.

En la actualidad, la biología sintética se ha definido como la síntesis de biomoléculas o ingeniería de sistemas biológicos con funciones nuevas que no se encuentran en la naturaleza⁽¹¹⁾, el objetivo principal es el diseño de sistemas que no existen en el medio ambiente; este término (biología sintética) fue utilizado por primera vez en 1912 por Leduc; también es conocida como genómica sintética, biología constructiva o biología de sistemas, la cual implica la creación de nuevos organismos y el rediseño de sistemas biológicos existentes para que ejecuten tareas específicas empleando el sistema CRISPR/Cas⁽¹²⁾.

El sistema CRISPR/Cas es un mecanismo de defensa en bacterias y arqueas análogo al silenciamiento con ARN interferente en eucariotas, su principal función es identificar y degradar secuencias de ácidos nucleicos exógenos⁽¹³⁾; está compuesto por ARN cortos llamados crARN y tracrARN provenientes de la secuencia CRISPR, endonucleasa Cas y por genes asociados a Cas⁽¹⁴⁾; la secuencia CRISPR se compone de un líder o promotor y distintas secuencias espaciadoras de 25 a 50 nucleótidos⁽¹⁵⁻¹⁷⁾.

El objetivo de esta revisión bibliográfica es conocer las aplicaciones de la nanobiotecnología relacionadas con el uso del sistema CRISPR/Cas en el almacenamiento de información en el ADN bacteriano y alternativas terapéuticas.

Materiales y métodos

Se realizó una revisión bibliográfica sobre las principales aplicaciones de la nanobiotecnología, empleando las bases de datos: ScienceDirect, SciELO y PubMed, de igual manera en revistas como: Nature Biotechnology, Biochemistry,

Science y Journal Microbiology. Se realizó la búsqueda utilizando palabras clave en inglés (Biotechnology, DNA Recombinant, CRISPR Immunologic Memory, Genetic engineering) validadas en DeCS. Se determinó el promedio de palabras clave y combinaciones en las bases de datos empleadas; para cada palabra clave se encontró un total de 243.454 para Biotechnology, 105.601 para DNA recombinant, 76 para CRISPR inmunologic y 126.138 para Genetic engineering. Se utilizaron seis combinaciones posibles de las palabras clave, encontrando en promedio por base de datos un total de: 20.136 artículos en Science Direct, 1.181 en Scielo y 7.835 Pubmed. Finalmente, aplicando criterios de inclusión y exclusión se trabajó con un total de 53 referencias para la construcción de la revisión. Se estipuló un intervalo de fecha para las publicaciones, a partir del año 2007 hasta el 2016, considerándose artículos originales y/o de revisión disponibles en inglés o español.

Resultados y discusión

La nanotecnología

Una vez fue propuesto el término de nanotecnología, en el artículo: "*Nanotecnología consiste en el procedimiento de separación, consolidación y deformación de materiales átomo por átomo o molécula por molécula*" en 1974, surgió la teoría propuesta por el Dr. K. Eric Drexler en el que proponía que los átomos y las moléculas se podían tocar. En la década de los 80's, diversos estudiosos en colaboración con investigadores finlandeses apoyaron dicha teoría, finalmente la comunidad científica terminó por aceptar e instaurar la nanotecnología como una ciencia del futuro. Desde entonces, el nombre nanotecnología viene siendo utilizado para caracterizar los nuevos avances tecnológicos desenvueltos por la nanociencia⁽¹⁸⁾.

Dentro del conjunto de revoluciones tecnológicas multidisciplinarias enfocados en la nanociencia se encuentra el análisis conjunto de genes que pueden identificar las vías etiológicas y alteraciones funcionales, por esta razón se están originando nuevos conocimientos biológicos y

alternativas para tratar enfermedades que antes eran consideradas incurables, siendo estos los primeros pasos en la creación de algoritmos genéticos, inspirado en el concepto de evolución biológica como ocurre en el cáncer; el procedimiento consiste en la realización de cruce de información genética y detección de mutaciones presentes en los cromosomas de los descendientes de pacientes con cáncer, ayudando a definir potenciales enfermos basado en la selección de categorías, utilizando clasificadores específicos⁽¹⁹⁾.

Las diferentes aplicaciones que puede tener la nanotecnología en la medicina, ha llevado a la posibilidad de manipulación y edición del genoma, permitiendo el establecimiento de las relaciones causales entre genotipos y fenotipos, conllevando a avances importantes en la investigación básica y aplicada, que proyecta un futuro promisorio en la investigación biomédica⁽²⁰⁾.

La tecnología CRISPR/Cas, es posiblemente uno de los mayores avances científicos del siglo XXI, la actividad de la proteína Cas, conduce a aprovechar esta función biológica para transformarla en una tecnología de ingeniería genética, de esta manera, se podrían eliminar o insertar secuencias específicas de ADN con increíble precisión⁽²¹⁾. Esta herramienta molecular ha causado una revolución científica al abrir la puerta a aplicaciones muy poco comparables en la historia científica reciente, la posibilidad de editar el genoma de cualquier célula u organismo por ingeniería genética, promete cambiar los modelos biotecnológicos y catalogar a los actuales como desfasados⁽²²⁾.

Sistema CRISPR/Cas

El sistema CRISPR/Cas, está compuesto por el precursor de ARN que es procesado en sus componentes maduros funcionales, los ARN cortos llamados crARN y tracrARN y por genes asociados a Cas (CRISPR-associated)⁽¹⁴⁾; CRISPR y Cas están estructurados de la siguiente manera: CRISPR corresponde a un locus que contiene los espaciadores adquiridos de virus, plásmidos o cualquier material genético detectado como

perjudicial para el microorganismo, y el locus Cas (CRISPR-asociado) que codifica para proteínas nucleasas requeridas para la defensa multipaso contra los elementos genéticos invasivos del sistema⁽¹⁷⁾; como mecanismo de defensa, la actuación de CRISPR/Cas se resume en tres pasos importantes: adquisición, expresión e interferencia^(15,16).

La primera etapa inicia con el proceso de adquisición, en donde se reconoce un elemento portador de material genético como agente invasivo que contiene los espaciadores hipervariables adquiridos a partir de ADN de virus o plásmido, éste identifica en su secuencia un fragmento determinado con el nombre de protoespaciador o PAM, al ingresar a la célula éste se corta y se integra en el locus CRISPR en el extremo 5' tras la secuencia líder y una de las repeticiones cambia su nombre espaciador^(15,23); existen casos en los que el PAM en su entorno, genera una o varias secuencias conservadas cuya función es buscar que el sistema CRISPR/Cas logre ser reconocido fácilmente⁽²⁴⁾.

Tras esto, los espaciadores se expresan en forma de un transcrito de ARN primario denominado precrARN portador de todos los espaciadores del locus que posteriormente son cortados por endonucleasas en fragmentos más pequeños (crARN), cada uno de ellos se conoce como el espaciador con una repetición parcial que puede tomar forma de horquilla; cuando el microorganismo sufre un ataque del agente invasivo, este crARN acompañado de proteínas Cas entre otras, se une por complementariedad de bases a la secuencia previamente adquirida señalizando a las nucleasas que deben cortar el elemento genético externo, todos estos acontecimientos, permiten al microorganismo identificar como diana de corte, a elementos extraños portadores de material genético y así, neutralizarlos^(25,26).

El sistema CRISPR/Cas sigue funcionando en el campo de la biotecnología y específicamente de la ingeniería genética, "identifica" un sitio específico del ADN y al mismo tiempo permite editarlo, siendo una ventaja, puesto que permite cambiar una mutación puntual que impide la

formación de una proteína, o la eliminación de variantes defectuosas de un gen⁽²⁷⁾. La tecnología CRISPR/Cas, logra identificar un segmento específico de ADN y eliminarlo o reemplazarlo, usando siempre las mismas herramientas: un ARN dúplex con la copia del ADN que se debe identificar (sgARN) y con una secuencia corta adyacente al protoespaciador (PAM)⁽²⁸⁾, que se unirá al ADN y estabilizará la proteína Cas9, proteína con actividad de endonucleasa y helicasa guiada por el sgARN que separa y corta las dos hebras de ADN^(22,29).

Memoria bacteriana

En el año 2016 los científicos Seth Shipman y Jeff Nivala de la Universidad de Harvard, desarrollaron un nuevo método para escribir información en el código genético de las células bacterianas vivas, estos microorganismos transfieren la información a sus descendientes, para ser leída posteriormente a través de su genotipo bacteriano⁽³⁰⁾, estos métodos permiten grabar información en el código genético de los microorganismos, en el que se utiliza la inmunidad bacteriana para el empleo del sistema CRISPR.

Investigadores de la Universidad de Washington demostraron que se puede fabricar de manera sintética ADN en el laboratorio y escribir cualquier tipo de información que se desee en él; para demostrarlo, transfirieron información de un libro con algunas imágenes en las cadenas de ADN bacteriano, sin embargo, los especialistas de Harvard han presentado la alternativa de sintetizar y cortar el ADN en la célula viva, aprovechando los mecanismos de defensa que protege a algunas bacterias del contacto con los virus conocida como sistema CRISPR/Cas^(22,31).

Las bacterias y arqueas han evolucionado en cuanto a sus mecanismos de defensa y de regulación para actuar frente a los diversos factores de estrés ambiental, incluyendo ataques de virus⁽³¹⁾, este método se ha expandido en el reciente descubrimiento del sistema CRISPR/Cas, que tiene dos características novedosas, en primer lugar, se puede incorporar específicamente secuencias cortas de la invasión de elementos genéticos (virus o plásmidos) en

una región de su genoma que se distingue por el sistema (CRISPR)⁽³²⁾; en segundo lugar, estas secuencias se transcriben y se procesan en pequeños ARNs (ácido ribonucleico), que guían un complejo de proteína multifuncional (proteínas Cas) que permite reconocer y escribir en el material genético^(33,34).

Una vez centrados en la ingeniería genética, entendiendo esta como la aplicación de las tecnologías del ADN recombinante a problemas biológicos, médicos o agrícolas específicos⁽³⁵⁾, aparecen nuevas técnicas significativamente más eficaces y a un costo comparativamente más económico, que tienen como fin manipular el material genético de cualquier célula; estas técnicas de edición genómica se basan en su mayoría en enzimas nucleasas programables como meganucleasas⁽³⁶⁾, nucleasas con dedos de zinc (ZFNs), nucleasas efectoras tipo activación de la transcripción (TALENs)⁽³⁷⁾ y en agrupaciones del sistema (CRISPR/Cas)^(15,38).

ADN sintético

Otra de las técnicas disponibles para almacenar información en el ADN bacteriano es el método artificial basado en la producción de ADN sintético; a principios de los años setenta el mundo científico vivía una efervescencia especial, como resultado de la aplicación práctica de esas “tijeras moleculares” que en realidad son las enzimas de restricción⁽³⁹⁾. En 1972, Paul Berg utilizó esas “tijeras” para construir la primera molécula de ADN recombinante, entre un vector vírico animal, SV40 y un fragmento de ADN del fago λ; un año más tarde, Stanley Cohen y Herbert Boyer consiguieron introducir un plásmido recombinante en la bacteria *Escherichia coli*, y hacer que se replicara dentro de ella, transmitiéndose a las sucesivas generaciones bacterianas⁽⁴⁰⁾.

En 2008, Hamilton Smith y Craig Venter propusieron construir el primer genoma sintético tomando como base el genoma de *Mycoplasma genitalium*, esta bacteria tiene el genoma más pequeño de los conocidos a la fecha, posee cerca de 485 genes, de los cuales 100 no son estrictamente necesarios para su supervivencia bajo condiciones óptimas⁽⁴¹⁾. El

diseño del genoma de este microorganismo buscaba utilizar la menor cantidad de genes posibles, de tal manera que funcionara al introducirlo en células bacterianas para estudiar su capacidad de generar las funciones genéticas esenciales para la vida. Para producir el genoma de *Mycoplasma genitalium*, se establecieron métodos para ensamblar y clonar gran cantidad de moléculas sintéticas de ADN, como resultado de este ensamblaje se obtuvo un cromosoma construido con un contenido de 381 genes (al cual se le denominó *Mycoplasma laboratorium*), de modo que cuando el genoma se introduce en una célula bacteriana, no funciona debido a que su metabolismo celular se torna lento y no se observa la duplicación de la célula^(42,43). Sin embargo, a lo largo del tiempo, el almacenamiento de información en el ADN ha tenido muchas ventajas potenciales siendo un medio para necesidades inmutables de alta latencia de almacenamiento de información⁽⁴⁴⁾.

Interpretación de la información codificada en el ADN bacteriano

La información que los científicos habían logrado almacenar de forma permanente en una célula viva era de 11 bits; con la nueva técnica del CRISPR/Cas y ADN sintético se amplió a un registro de aproximadamente 100 bytes de datos, buscando recopilar frases extensas y completas en el ADN⁽⁴⁵⁾.

Los segmentos utilizados fueron cadenas de ADN usando sus bases nitrogenadas para representar un valor binario, donde la timina (T) y guanina (G) son el uno, y la adenina (A) y citosina el dos (C). Una de las limitaciones respecto a la introducción de mensajes codificados de ADN viral a bacterias, radica en que no todas las bacterias adquieren el mensaje e inclusive algunas lo pierden⁽³⁰⁾, así que si se fuese a introducir palabra por palabra, el código de la frase se identificaría de la siguiente manera: *"Este mensaje está en sus genes"*, utilizando seis fracciones de ADN viral; no todas las bacterias tendrían el mensaje completo, en algunas se introduciría lo equivalente a la frase *"Está en los genes"*, mientras que otras sólo pueden tener *"los genes"*, y así sucesivamente; incluso con estos *"errores"* Shipman afirma que se puede

determinar el genotipo rápidamente de pocos miles o millones de bacterias en una colonia, debido a que el mensaje siempre se registra secuencialmente diferente para cada una de ellas. Por otro lado, la capacidad de almacenar 100 bytes no está cerca del límite de información que podría grabarse en el genoma bacteriano de algunas células microbianas como *Sulfolobus tokodaii*, este microorganismo tendrían espacio para más de 3000 bytes de datos, y más aún con las facilidades que brinda la ingeniería sintética, su espacio de almacenamiento podría incrementar⁽⁴⁵⁾.

Existe una variedad de lenguajes de programación para permitir el procesamiento de la información, entre estos se encuentra el Procesador Pre Hipertexto (PHP) por sus siglas en inglés Pre Hypertext -processor⁽⁴⁶⁾, el cual es un lenguaje de programación de uso general de código del lado del servidor originalmente diseñado para el desarrollo web de contenidos dinámicos⁽⁴⁷⁾. Durante la última década, los investigadores han construido una buena cantidad de partes genéticas que se pueden programar, incluyendo sensores, redes e incluso los interruptores de memoria^(30,46).

"Es, literalmente, un lenguaje de programación para las bacterias", dice Christopher Voigt, profesor de ingeniería biológica, afirma que *"se utiliza un lenguaje basado en texto, al igual que lo está programando una computadora, luego de tomar ese texto se compila y se convierte en una secuencia de ADN que se pone en la célula, y el circuito se ejecuta dentro de la célula"*; el lenguaje se basa en Verilog, una lengua de uso de componentes electrónicos, especialmente los chips de computadora para programar y desarrollar el nuevo idioma; Voigt y su equipo diseñaron sus propios elementos de computación, tales como puertas lógicas y sensores que pueden ser codificados en el ADN de una célula bacteriana; los sensores pueden detectar diferentes sustancias o compuestos, tales como oxígeno y glucosa, así como los parámetros físicos como luz, temperatura y acidez; está diseñado de una manera que permite a los usuarios añadir sus propios sensores⁽³⁰⁾.

Por ahora, todas estas características se han personalizado para *Escherichia coli*, sin embargo, los investigadores están trabajando en la expansión de la lengua a otras bacterias; el uso de este lenguaje ya ha programado 60 circuitos con diferentes funciones y 45 de ellos trabajaron correctamente la primera vez que se pusieron a prueba, siendo un logro notable; los circuitos también fueron sorprendentemente rápidos, y todo el proceso promete revolucionar la ingeniería del ADN; antes podría tomar meses o años para diseñar un circuito de este tipo, ahora se puede hacer en menos de un día, incluso investigadores de la Universidad de Harvard ya están estudiando algunas aplicaciones potenciales que incluyen:

- Bacterias que pueden ser consumidas para ayudar en la digestión de la lactosa.
- Bacterias que pueden vivir en las raíces de las plantas y producir un insecticida si tienen la sensación de ser atacadas⁽³⁰⁾.

Tratamiento del cáncer usando la nanotecnología

El cáncer es el resultado de la acumulación de múltiples alteraciones en genes que regulan el crecimiento celular, traen consigo daños a nivel morfológico y metabólico en las células que las presentan, ya que muchas de estas alteraciones son irreversibles, considerándose de gran importancia un diagnóstico oportuno que garantice una recuperación eficaz de este tipo de patologías^(48,49). Para noviembre de 2016, investigadores de la Universidad de Sichuan en China, lograron inyectar por primera vez en un paciente con cáncer de pulmón, linfocitos genéticamente modificados con el fin de generar una respuesta inmune eliminando las células tumorales empleando la tecnología CRISPR-Cas, creando una reestructuración del gen que codifica la proteína PD-1 (Programmed Death-1), receptor de superficie celular que cuya función es la regulación negativa del sistema inmunitario y la promoción de la auto-tolerancia empleando como mecanismo la supresión de la actividad inflamatoria de las células T. Aunque existe la inmunoterapia en la que se puede inactivar el gen PD-1, se espera que esta nueva tecnología sea una estrategia terapéutica con mayor eficiencia y estabilidad⁽⁵⁰⁾.

Las propiedades del sistema CRISPR/Cas han permitido abrir la posibilidad de emplearlo para realizar terapia génica y celular; se ha usado como herramienta para realizar mutaciones puntuales, recombinación homóloga por reparación dirigida por homóloga (HDR), silenciamiento y activación o represión de la transcripción de genes; gracias a estas propiedades, ha sido posible su aplicación para el monitoreo genético, análisis de rutas metabólicas, investigación de genómica funcional, generación de modelos animales, descubrimiento de posibles blancos para el tratamiento de enfermedades e incluso, corrección de fenotipos⁽¹³⁾.

Los diversos usos que se le han dado al sistema CRISPR/Cas han permitido observar su aplicación en terapias génicas. En líneas celulares de osteosarcoma, el silenciamiento estable de Quinasa dependiente de ciclina (Cdk11), con CRISPR/Cas aumenta la muerte celular, disminuye la migración y reduce la invasión por células malignas⁽⁵¹⁾; en otros experimentos, se corrigieron el gen *Fah* para la tirosinemia⁴³ y el gen *Dmd* para la distrofia a muscular de Duchenne⁽⁵²⁾ y en células madre intestinales de pacientes con fibrosis quística, se logró la modificación del receptor de membrana CFTR (Cystic Fibrosis transmembrane conductance regulator). Estas evidencias confirman que CRISPR/Cas es un sistema viable y eficaz, aplicable en modelos de animales adultos, para el desarrollo de terapias génicas⁽⁵²⁾.

En terapia celular también ha sido empleado con una alta eficiencia, en el reemplazo celular a través de modificaciones *in vivo* de células para volver a introducir las, creando una importante oportunidad de aplicación para CRISPR en la terapia. Esto se ha considerado para enfermedades neurodegenerativas como Huntington, Parkinson, Alzheimer y esclerosis lateral amiotrófica, debido a la pérdida progresiva en el número de neuronas⁽⁵³⁾.

Conclusiones

La biología sintética ha contribuido en el descubrimiento de métodos basados en la

nanobiotecnología; se ha demostrado dos métodos para grabar información en el ADN de células bacterianas, entre ellos el método artificial mediante el cual se genera un ADN sintético, y uno natural basado en el sistema CRISPR/Cas, que utiliza los mecanismos de defensa de los microorganismos para codificar información en sus genes, además de identificar capacidad de almacenamiento hasta los 3000 bytes, logrando grabar frases completas en microorganismos que la asimilen adecuadamente como *E. coli* y *S. tokodaii*, tendiendo a incrementar su capacidad de almacenamiento; además de esto, los científicos buscan experimentar en otro tipo de microorganismos bacterianos o células vivas que permitan acelerar el proceso de almacenamiento en sus genes.

Se estima que en la actualidad el uso de la nanobiotecnología traerá beneficios para el ser humano, facilitándole procesos y mejorando su calidad de vida; el ADN sintético y el sistema CRISPR/Cas, no solo servirán como medio portátil de información sino que a futuro permitirán curar enfermedades cuya causa genética se conozca y que hasta ahora son incurables como la Corea de Huntington, el Síndrome de Down o la Anemia falciforme; de igual forma en la creación de seres vivos clonados y modificados genéticamente.

Los dispositivos de almacenamiento de información tecnológicos en un futuro serán remplazados por células vivas, puesto que con el nuevo sistema para grabar información en el ADN de microorganismos se podrá guardar texto, imágenes, videos, música, juegos en una alta capacidad de almacenamiento y de gran facilidad para revelar la información.

La tecnología del sistema CRISPR/Cas puede ser una gran herramienta en el desarrollo de terapias biotecnológicas, su capacidad para realizar correcciones a nivel genético, generar deleciones y regular la transcripción o traducción puede emplearse para abordar una serie de enfermedades a distintos niveles. Sin embargo, este sistema debe disminuir su tasa de

mutaciones fuera del objetivo para poder ser considerada una alternativa de terapia viable.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existen conflictos de intereses.

Referencias

1. Pájaro-Castro N, Olivero-Verbel J, Redondo-Padilla J. Nanotecnología aplicada a la medicina. Revista Científica Guillermo de Ockham. 2013;11(1):125-1.
2. Bernal CPJ, Salazar XJN, Edison J, Oliveros B, editors. Biología sintética: aplicaciones y dilemas éticos. III Congreso Internacional de la REDBIOÉTICA UNESCO para América Latina y el Caribe Bioética en un continente de exclusión: de la reflexión a la acción; 2010.
3. Buldú JM, Wagemakers A, Sanjuán MA, Coloma A, de Luís O. Redes genéticas sintéticas: de lo simple a lo complejo. Revista española de física. 2007;21(3):10-6.
4. Faria-Tischer PC, Tischer CA. Nanobiotechnology: platform technology for biomaterials and biological applications the nanostructures. Biochem. Biotechnol. Rep. [Internet] 2012. [cited 2016 jul 7];1(1):32-53. Available from: https://www.researchgate.net/profile/Cesar_Tischer/publication/282287728_13190-53058-1-PB/links/560a857d08ae4d86bb139554.pdf
5. Britto FM, Castro GR. Nanotecnología, hacia un nuevo portal científico-tecnológico. Revista Química Viva. 2012;11(3):171.
6. Quadros ME, Pierson IVR, Tolve NS, Willis R, Rogers K, Thomas TA, et al. Release of silver from nanotechnology-based consumer products for children. Environmental science & technology. 2013;47(15):8894-901.
7. Mejias-Sánchez Y, Cabrera-Cruz N, Toledo-Fernández AM, Duany-Machado OJ. La nanotecnología y sus posibilidades de aplicación en el campo científico-tecnológico. Revista Cubana de Salud Pública. 2009;35(3):1-9.
8. Gutiérrez BJA, Meléndez AL, Liñan CYR, López DAL. La nanotecnología a 40 años de su aparición: Logros y tendencias. Ingenierías. 2015;18(66):13-22.
9. Zhang L, Webster TJ. Nanotechnology and nanomaterials: promises for improved tissue regeneration. Nano today. 2009;4(1):66-80.
10. Romero-Morelos P, Peralta-Rodríguez R, Mendoza-Rodríguez M, Valdivia-Flores A, Marrero-Rodríguez D, Paniagua-García L, et al. La nanotecnología en apoyo a la investigación del cáncer. Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social. 2011;49(6):621-30.
11. Ruiz-Mirazo P, Moreno-Bergareche AJ. Biología sintética: enfrentándose a la vida para comprenderla, utilizarla o extenderla. Revista de pensamiento contemporáneo. 2012;(38):28-37.

12. de Lorenzo V. Biología sintética: la ingeniería al asalto de la complejidad biológica. *Arbor*. 2014;190(768):a149.
13. Lammoglia-Cobo MF, Lozano-Reyes R, Daniel C, Muñoz-Soto RB, López-Camacho C. La revolución en ingeniería genética: sistema CRISPR/Cas. *Investigación en Discapacidad*. 2016;5(2):116-28.
14. Casillas FL. CRISPR, el sueño divino hecho realidad. *Rev Fac Med*. 2015;58(4):55-60.
15. Hsu PD, Lander ES, Zhang F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell*. 2014;157(6):1262-78.
16. Makarova KS, Haft DH, Barrangou R, Brouns SJ, Charpentier E, Horvath P, et al. Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. *Nature Rev Microbiol*. 2011;9(6):467-77.
17. Al-Attar S, Westra ER, van der Oost J, Brouns SJ. Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPRs): the hallmark of an ingenious antiviral defense mechanism in prokaryotes. *J Biol Chem*. 2011;392(4):277-89.
18. Quintili M. Nanociencia y Nanotecnología... un mundo pequeño. *Cuadernos del Centro de Estudios en Diseño y Comunicación Ensayos*. 2012;(42):125-55.
19. Fernández RA, Villacis SC, Posada RA, Posada MA, editors. *Análisis Holístico de Nuevos Desafíos, Paradigmas Tecnológicos y Fundamentos Bioéticos en la Medicina Futurista*. Conference Proceedings. 2017;1(1):410-420.
20. Schmidt F, Platt RJ. Applications of CRISPR-Cas for synthetic biology and genetic recording. *Current Opinion in Systems Biology*. 2017;5:9-15.
21. Schaefer KA, Wu W-H, Colgan DF, Tsang SH, Bassuk AG, Mahajan VB. Unexpected mutations after CRISPR-Cas9 editing in vivo. *Nature methods*. 2017;14(6):547-8.
22. Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*. 2013;339(6121):819-23.
23. Fineran PC, Charpentier E. Memory of viral infections by CRISPR-Cas adaptive immune systems: acquisition of new information. *Annu Rev Virol*. 2012;434(2):202-9.
24. Nam KH, Ding F, Haitjema C, Huang Q, DeLisa MP, Ke A. Double-stranded endonuclease activity in *Bacillus halodurans* clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)-associated Cas2 protein. *J Biol Chem*. 2012;287(43):35943-52.
25. Barrangou R. CRISPR-Cas systems and RNA-guided interference. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*. 2013;4(3):267-78.
26. Horvath P, Barrangou R. CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. *Science*. 2010;327(5962):167-70.
27. Doudna JA, Charpentier E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*. 2014;346(6213):1258096.
28. Wiedenheft B, Sternberg SH, Doudna JA. RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea. *Nature*. 2012;482(7385):331-8.
29. Babu M, Beloglazova N, Flick R, Graham C, Skarina T, Nocek B, et al. A dual function of the CRISPR-Cas system in bacterial antiviral immunity and DNA repair. *Molecular microbiology*. 2011;79(2):484-502.
30. Mico A. Harvard team turns bacteria into living hard drives. *Bucarest: ZME Science*; 2016. Disponible en: <http://www.zmescience.com/research/bacteria-drives-56791/>
31. Bhaya D, Davison M, Barrangou R. CRISPR-Cas systems in bacteria and archaea: versatile small RNAs for adaptive defense and regulation. *Annual review of genetics*. 2011;45:273-97.
32. Sampson TR, Saroj SD, Llewellyn AC, Tzeng Y-L, Weiss DS. A CRISPR/Cas system mediates bacterial innate immune evasion and virulence. *Nature*. 2013;497(7448):254-7.
33. Mojica F, Diez-Villasenor C, Garcia-Martinez J, Almendros C. Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system. *Microbiology*. 2009;155(3):733-40.
34. Datsenko KA, Pougach K, Tikhonov A, Wanner BL, Severinov K, Semenova E. Molecular memory of prior infections activates the CRISPR/Cas adaptive bacterial immunity system. *Nature communications*. 2012;3:945.
35. Bortesi L, Fischer R. The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing and beyond. *Biotechnology advances*. 2015;33(1):41-52.
36. Stoddard BL. Homing endonucleases: from microbial genetic invaders to reagents for targeted DNA modification. *Structure*. 2011;19(1):7-15.
37. Urnov FD, Rebar EJ, Holmes MC, Zhang HS, Gregory PD. Genome editing with engineered zinc finger nucleases. *Nat Rev Genet*. 2010;11(9):636-46.
38. Cox DBT, Platt RJ, Zhang F. Therapeutic genome editing: prospects and challenges. *Nat Med*. 2015;21(2):121-31.
39. Baltimore D, Berg P, Botchan M, Carroll D, Charo RA, Church G, et al. A prudent path forward for genomic engineering and germline gene modification. *Science*. 2015;348(6230):36-8.
40. Kayser MS, Biron D. Sleep and Development in Genetically Tractable Model Organisms. *Genetics*. 2016;203(1):21-33.
41. Shokralla S, Spall JL, Gibson JF, Hajibabaei M. Next-generation sequencing technologies for environmental DNA research. *Mol Ecol*. 2012;21(8):1794-805.
42. Dorman CJ. Regulation of transcription by DNA supercoiling in *Mycoplasma genitalium*: global control in the smallest known self-replicating genome. *Molecular microbiology*. 2011;81(2):302-4.
43. Gibson DG, Glass JI, Lartigue C, Noskov VN, Chuang R-Y, Algire MA, et al. Creation of a bacterial cell controlled by a chemically synthesized genome. *science*. 2010;329(5987):52-6.
44. Church GM, Gao Y, Kosuri S. Next-generation digital information storage in DNA. *Science*. 2012;337(6102):1628.
45. Nielsen AA, Der BS, Shin J, Vaidyanathan P, Paralanov V, Strychalski EA, et al. Genetic circuit design automation. *Science*. 2016;352(6281):aac7341.
46. AlBar AM, Hoque MR. Development of Web-Based e-Discipline System: A Case Study for the Kingdom of Saudi Arabia. *JACN*. 2015;3(3)243-246.

47. Sandoval MGG, Torrado HDA, Pinzón ML, Fuentes ASF. Buenas prácticas aplicadas a la implementación colaborativa de aplicativos web. *Revista MundoFesc.* 2016;2(10):27-30.
48. Tyagi N, Arora S, Deshmukh SK, Singh S, Marimuthu S, Singh AP. Exploiting nanotechnology for the development of MicroRNA-based cancer therapeutics. *Journal of Biomedical Nanotechnology.* 2016;12(1):28-42.
49. Douda J, Calva P, Torchynska T, Peña Sierra R, de la Rosa Vázquez J. Marcadores Cuánticos para la Detección de Cáncer: Revisión. *Superficies y vacío.* 2008;21(4):10-5.
50. Castillo A. Edición de genes para el tratamiento del cáncer de pulmón (CRISPR-Cas9). *Colombia Medica.* 2016;47(4):178-81.
51. Feng Y, Sassi S, Shen JK, Yang X, Gao Y, Osaka E, et al. Targeting Cdk11 in osteosarcoma cells using the CRISPR-cas9 system. *Journal of orthopaedic research.* 2015;33(2):199-207.
52. Long C, McAnally JR, Shelton JM, Mireault AA, Bassel-Duby R, Olson EN. Prevention of muscular dystrophy in mice by CRISPR/Cas9-mediated editing of germline DNA. *Science.* 2014;345(6201):1184-8.
53. Jung YW, Hysolli E, Kim KY, Tanaka Y, Park IH. Human induced pluripotent stem cells and neurodegenerative disease: prospects for novel therapies. *Current opinion in neurology.* 2012;25(2):125.