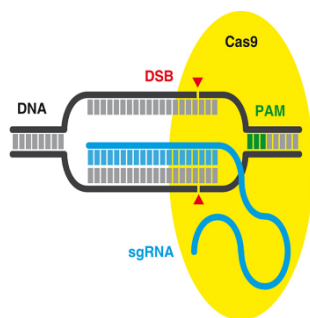


Avances en biotecnología: secuenciación y análisis masivo y técnicas de edición genética y biología sintética.

Josefa Muñoz Alamillo. Dpto Botánica, Ecología y Fisiología Vegetal. Universidad de Córdoba.

La biotecnología aplicada a la ingeniería genética no es una disciplina nueva, pero si es probablemente una de las disciplinas que ha experimentado una evolución más exponencial en los últimos tiempos. Uno de los hitos de esos avances revolucionarios está precisamente en el descubrimiento de las herramientas de edición genética. Entre ellas la de mayor aplicación actualmente, el sistema CRISPR/Cas, considerado como las tijeras mágicas de la edición genómica, ha supuesto uno de los 10 hitos más relevantes de la biotecnología. Las secuencias CRISPR (**C**lustered **R**egularly **I**nterspaced **S**hort **P**alindromic **R**epeats) son, en origen, repositorios de secuencias cortas que representan las huellas o cicatrices que dejan las infecciones por fagos o virus en las bacterias, y que estas utilizan para reconocer y evitar una infección posterior, es decir, forman parte de la defensa frente a infecciones de los procariontes. El segundo elemento importante del sistema es la nucleasa Cas (Cas 9 de *Streptococcus pyogenes* es la más conocida, pero dependiendo del microorganismo existe una amplia diversidad de estas proteínas). La secuencia que codifica esta proteína está en el mismo operón que las secuencias CRISPR, lo que implica que cada vez que se expresen está también lo hará la nucleasa. Esta nucleasa cortará específicamente las secuencias complementarias a las CRISPR, es decir, se comportará como unas tijeras dirigidas a cortar una secuencia específica. La traducción de este sistema inmune ancestral en una potentísima herramienta biotecnológica es lo que ha supuesto la concesión del Nobel de Química (2020) a las investigadoras Emmanuelle Charpentier y Jennifer Doudna, a pesar de que un investigador español, Francisco Martínez Mojica, había descubierto las secuencias CRISPR años antes trabajando con arqueas en la Universidad de Alicante.

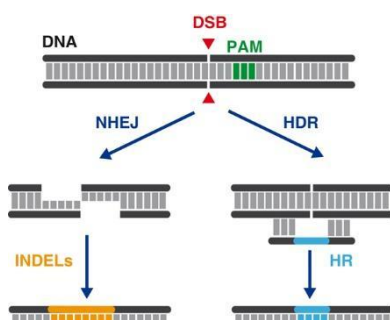
Pero la aplicación del sistema CRISPR/Cas, que dirige el corte a una secuencia específica, depende estrictamente de conocer las secuencias genómicas que se quieran “cortar” y modificar o editar.



[Esquemas del Prof. Lluís Montoliu](#)

Para usar esta herramienta necesitamos disponer de la nucleasa o de la secuencia que codifica la nucleasa. La nucleasa corta específicamente a 3-4 nucleótidos de distancia una secuencia específica, la secuencia PAM (“protospacer adjacent motif”), en el ADN.

Necesitamos “fabricar” un molde del sitio de corte: una **secuencia específica** (20 nucleótidos pertenecientes al gen o a la secuencia que queremos cortar, adyacentes a la secuencia PAM, que sea reconocida por la nucleasa y una estructura que “**porte y presente esa secuencia**”, el **sgRNA**. Necesitamos disponer de la nucleasa o de la secuencia que codifica la nucleasa. La nucleasa corta específicamente a 3-4 nucleótidos de distancia una secuencia específica, la secuencia PAM, en el ADN. Una vez que introducimos esta construcción en la célula obtenemos un **corte en la doble cadena del ADN**, a 3-4 nucleótidos de la secuencia PAM, y exactamente en la secuencia complementaria a la secuencia usada como molde o guía (20 nucleótidos).



Las células tienen que reparar rápidamente los daños en el ADN. El corte producido por la nucleasa se reparará con la maquinaria propia de la célula, generando bien

mutaciones, a través del sistema de reparación NHEJ (“**non homologous end joining**”) que liga rápidamente los extremos rotos sin una plantilla o bien recombinaciones, que pueden incorporar secuencias exógenas, si se le proporcionan los moldes adecuados a través de la recombinación homóloga HR (“**homologous recombination**”). Esta plantilla, con secuencias homólogas puede usarse para forzar la integración de cualquier secuencia siempre que este flanqueada por secuencias homólogas (inserción de genes o de secuencias reguladoras).

Pero los sistemas de edición genómica no solo usan nucleasas que corten el ADN, sino que se han diversificado de manera que en vez de cortar puedan, simplemente, cambiar los nucleótidos, modificar la o editar la secuencia, es decir “reescribir el genoma”, a nuestra conveniencia.

Pero todo esto solo es posible conociendo las secuencias de los genomas que se quieren modificar, y prediciendo los efectos que está modificación podrá causar. Por eso, esta revolución en la ingeniería genética solo es posible gracias a la evolución en los procesos de secuenciación masiva. Sirva como ejemplo los 13 que fueron necesarios para secuenciar el 92% del genoma humano (1990-2003), mientras que el 8% restante se secuenció en 2022 usando el sistema de secuenciación de fragmentos largos con tecnología T2T (“telomere to telomere”) de nanoporos, que no solo es más rápida, sino que se ha hecho mucho más económica y accesible.

Hoy en día no solo se pueden secuenciar los genomas de cohortes de pacientes, para identificar rápidamente las mutaciones o cambios responsables de la enfermedad, sino que también están ya disponibles las secuencias completas de los genomas de muchos organismos, incluidas muchas plantas, cuyos genomas son, en general mucho mayores que el genoma humano. Actualmente existen ya secuencias completas de más de 1800 especies de plantas, y solo en **2024**, se publicaron los genomas de **500 especies de plantas**, de las cuales 370 fueron secuenciadas por primera vez. Esto permite, hoy en día, transformar la agricultura, de forma mucho más rápida y efectiva de lo que hemos hecho a través de obtención de vegetales transgénicos. Pero es que, además, la edición genética puede generar vegetales mejorados, idénticos a los que se obtienen mediante técnicas de mejora genética clásica, basados en la selección de mutaciones naturales o en el cruzamiento de especies sexualmente compatibles, pero con características diferenciales. Sin embargo, la edición genética ofrece enormes ventajas, la primera es que se necesita muchísimo menos tiempo para generar un vegetal con características ventajosas que a través de la mejora genética, la segunda que el proceso es muchísimo más preciso, de manera que es mucho más fácil conseguir los resultados esperados. Algunos de estas mejoras se podrían hacer usando las técnicas clásicas de ingeniería genética, pero incluso entonces, obtendríamos vegetales transgénicos, que, aunque todas las pruebas demuestran que son absolutamente seguros, no gozan del prestigio que merecen entre la opinión pública. La edición genómica, en cambio, puede y lo esta haciendo, producir vegetales mejorados, sin incorporación de secuencias foráneas, y, por tanto, sin producir transgénicos, sino vegetales que bien podrían haber adquirido esas mejoras de manera natural. Esto abre una avenida infinita de posibilidades para obtener cultivos más eficientes, más resistentes, más nutritivos, etc. Para ello, solo es necesario hacer uso de las técnicas ya disponibles, tanto de secuenciación masiva, que revelen las diferencias reales entre especies mejor o peor adaptadas, así como otras técnicas también masivas, como transcriptómica, proteómica y metabolómica, que nos permiten analizar el conjunto de todos los cambios, de expresión de genes, de proteínas y de metabolitos que ocurren en respuesta a cualquiera de estas mejoras genéticas. Las posibilidades son infinitas, solo queda que apostemos por ellas, que informemos

de lo que hacemos, y que las instituciones aporten la financiación y la regulación necesaria de estos procesos.

Enlace de interés:

The CRISPR web: <https://wwwuser.cnb.csic.es/~montoliu/CRISPR/>

<https://doi.org/10.1016/j.copbio.2022.102876>