

Cre-LoxP como una opción en la investigación de las enfermedades cardiovasculares

Armando Totomoch-Serra,¹ José J. Aceves-Buendía,² María Chávez-Canales³ y Manlio F. Márquez-Murillo^{1*}

¹Departamento de Electrocardiología, Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez; ²Departamento de Neurología y Psiquiatría, Instituto Nacional de Ciencia Médicas y de la Nutrición Salvador Zubirán; ³Laboratorio de Fisiología Experimental, Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez. Ciudad de México, México

Resumen

El sistema Cre-LoxP se basa en la recombinación específica de sitios mediada por la recombinasa Cre. Este sistema permite un control espacio-temporal de la expresión génica en modelos inducibles, al utilizar promotores o potenciadores específicos que dirigen la expresión de la recombinasa Cre en tejidos particulares o en respuesta a señales externas en un momento dado de la vida del organismo modelo, como la administración de fármacos. En la investigación cardiovascular, el sistema Cre-LoxP ha sido fundamental para generar modelos murinos que replican condiciones patológicas humanas específicas. Una aplicación emergente del sistema Cre-LoxP es su uso en optogenética, donde permite la expresión de canales iónicos sensibles a la luz, facilitando la modulación de la actividad de tejidos como el corazón. Esta estrategia abre nuevas posibilidades para el estudio de la electrofisiología cardíaca y el desarrollo de terapias dirigidas.

PALABRAS CLAVE: Edición genética. Modelos experimentales. Optogenética. Investigación cardiovascular. Recombinasa Cre.

Cre-LoxP as an option in cardiovascular disease research

Abstract

The Cre-LoxP system is based on site-specific recombination mediated by the enzyme Cre recombinase. This system allows spatiotemporal control of gene expression in inducible models by utilizing specific promoters or enhancers that direct the expression of Cre recombinase in particular tissues or as a response to external signals at a specific moment in the life of the model organism, such as drug administration. In cardiovascular research, the Cre-LoxP system has been fundamental in generating mouse models replicating specific human pathological conditions. A growing area of interest is the use of Cre-LoxP in optogenetics, where it allows the expression of light-sensitive ion channels to modulate the activity of specific tissues such as the heart. This approach provides new avenues for studying cardiac electrophysiology and developing targeted therapeutic strategies.

KEYWORDS: Gene editing. Experimental models. Optogenetics. Cardiovascular. Cre recombinase.

*Correspondencia:

Manlio F. Márquez-Murillo

E-mail: manlio.marquez@cardiologia.org.mx

0016-3813/© 2025 Academia Nacional de Medicina de México, A.C. Publicado por Permanyer. Este es un artículo open access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Fecha de recepción: 13-12-2024

Fecha de aceptación: 01-09-2025

DOI: 10.24875/GMM.24000436

Gac Med Mex. 2026;162:180-185

Disponible en PubMed

www.gacetamedicademexico.com

Introducción

La edición genética en biología molecular es un conjunto de técnicas («herramientas») que hacen posible la alteración de uno o varios fragmentos del ADN de una misma especie, con la intención de modificar sus características. Entre estas herramientas, el sistema Cre-LoxP ha destacado por su versatilidad y eficacia, consolidándose como una técnica esencial para el estudio de las enfermedades cardiovasculares. Su capacidad para inducir recombinación específica en el ADN ha permitido estudiar funciones génicas en tejidos y tipos celulares particulares, así como en momentos concretos del desarrollo.

Fundamentos del sistema Cre-LoxP

El sistema Cre-LoxP se basa en la recombinación específica de sitios, mediada por la recombinasa Cre, una enzima derivada del bacteriófago P1 (especie indeterminada de bacteriófago temperado de la familia *Myoviridae* que infecta a *Escherichia coli*). Esta recombinasa reconoce y actúa sobre secuencias específicas del ADN conocidas como sitios LoxP (secuencia específica de ADN presente en el genoma del bacteriófago P1 que sirve como sitio para la recombinación mediada por la enzima Cre, cuyo nombre Lox proviene de *locus of crossover*, lugar de recombinación, y P se refiere al bacteriófago P1), que consisten en 34 pares de bases con una organización estructural particular: dos secuencias palindrómicas de 13 pares de bases flanqueando una secuencia central de 8 pares de bases. La inserción de estos sitios LoxP por medio de ingeniería genética y la selección de células portadoras se realizan en estadios tempranos del desarrollo. Una vez seleccionados los ejemplares, la orientación de estos sitios LoxP determina el resultado de la recombinación,¹ lo cual puede resultar en delección génica (Fig. 1A), inversión génica (Fig. 1B), translocación (Fig. 1C) o inserción (Fig. 1D).

Este sistema permite un control espacio-temporal de la expresión génica en ciertos modelos experimentales, mediante el uso de promotores o potenciadores específicos que dirigen la expresión de la recombinasa Cre en tejidos particulares o en respuesta a señales externas, en un momento determinado de la vida del organismo modelo. La inducción suele realizarse mediante la administración de fármacos, como tamoxifeno (más común) o tetraciclina (un sistema de

activación diferente). Un ejemplo de activación por tamoxifeno es el sistema Cre-RE, que utiliza un receptor de estrógeno mutado (RE) fusionado a la recombinasa Cre, ambos asociados a una proteína chaperona llamada HSP90 (Fig. 2A). Cuando se administra tamoxifeno, este induce la liberación de HSP90 del complejo Cre-ER, permitiendo la translocación de Cre-ER al núcleo, donde puede mediar la recombinación específica del ADN (Fig. 2B).

De los hitos en genética molecular a la manipulación selectiva en neuronas

El impacto de la edición genética en la medicina moderna ha sido reconocido con el Premio Nobel de Fisiología o Medicina en 2007, otorgado a Mario R. Capecchi, Sir Martin J. Evans y Oliver Smithies, por descubrir los principios para introducir modificaciones genéticas específicas en ratones mediante el uso de células madre embrionarias. Aunque el sistema Cre-LoxP no fue específicamente galardonado, los avances en la modificación genética en ratones, que estos científicos pioneros realizaron, sentaron las bases para el desarrollo y la amplia aplicación del sistema Cre-LoxP en posteriores investigaciones.

En diversas áreas de la medicina, como la neurología, se han desarrollado distintas variantes del sistema con un enfoque específico dependiendo del tipo celular, como es el caso del ratón TH: IRES-CRE recombinasa, el cual se expresa únicamente en neuronas dopaminérgicas, ya que utiliza el promotor del gen de la tirosina hidroxilasa (TH) y el elemento IRES (*Internal Ribosome Entry Site*) que permite la expresión de la recombinasa junto con TH.

En el sitio web de The Jackson Laboratory se encuentra un catálogo que incluye información acerca de unas 300 cepas de ratón, con datos sobre las líneas Cre y los reporteros Cre, los cuales están disponibles para adquisición o pueden ser diseñados a medida, según las necesidades (<https://www.jax.org/research-and-faculty/resources/cre-repository>).

Modelos Cre-LoxP en la investigación cardiovascular avanzada

En la investigación cardiovascular, el sistema Cre-LoxP ha sido fundamental para generar modelos murinos que reproducen condiciones patológicas humanas específicas, como hipertrofia cardíaca, insuficiencia cardíaca, miocardiopatía dilatada y aterosclerosis. Un ejemplo destacado es el uso del sistema

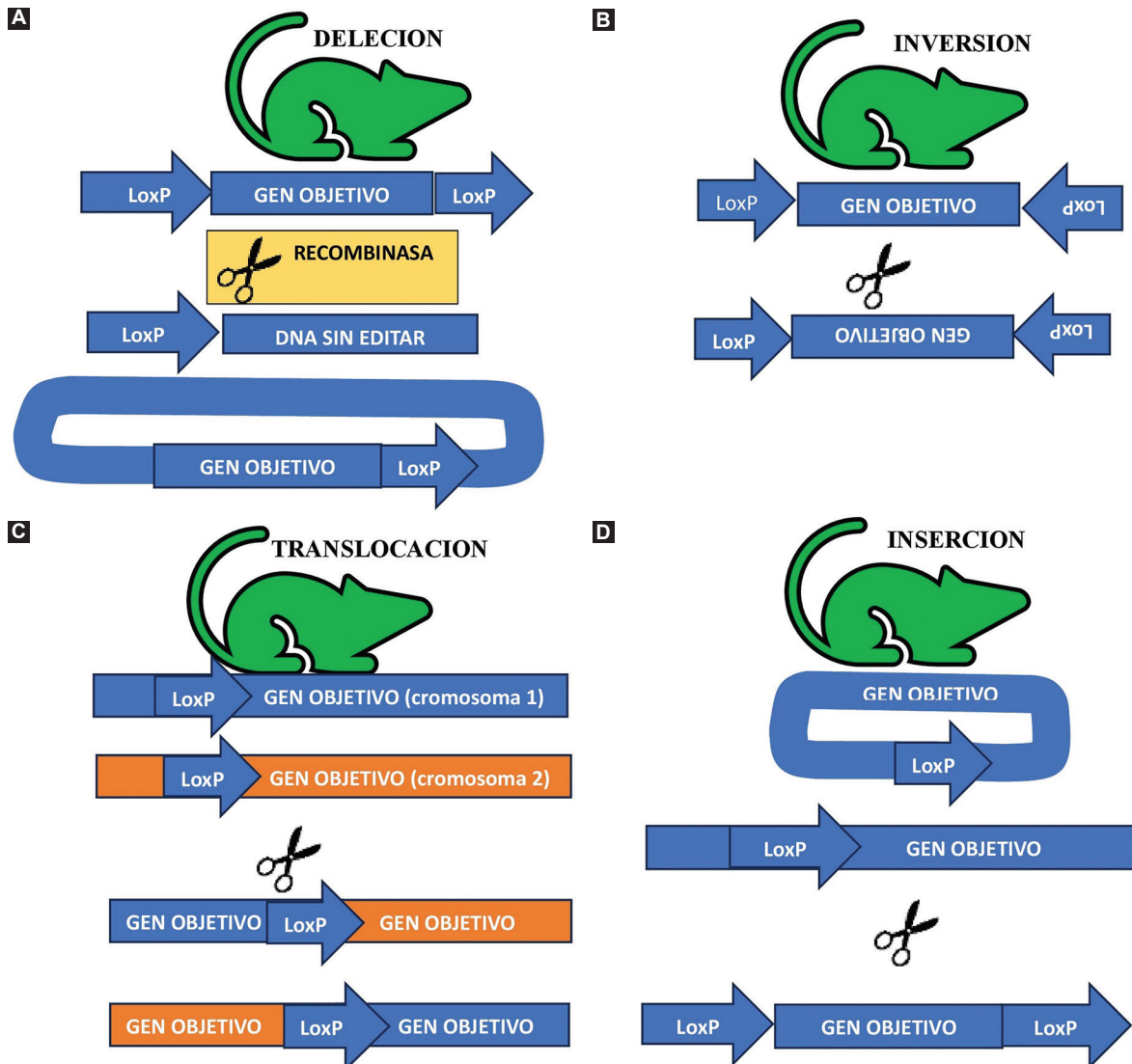


Figura 1. La enzima Cre recombinasa (tijeras) reconoce a los sitios LoxP (flechas), ocasionando un cambio de acuerdo con la orientación y la localización de los sitios LoxP. Arriba de la recombinasa se encuentra el ADN sin editar, y debajo de la recombinasa se encuentra el ADN editado. **A:** deleción. Si los sitios LoxP están alineados en la misma dirección, la recombinasa Cre escinde el fragmento de ADN entre ellos, eliminando la secuencia intermedia y uniendo los extremos resultantes. **B:** inversión. Cuando los sitios LoxP están orientados en direcciones opuestas, la secuencia entre ellos se invierte tras la acción de la recombinasa. **C:** translocación. En escenarios donde los sitios LoxP residen en cromosomas distintos, la recombinación puede resultar en una translocación, intercambiando segmentos entre los cromosomas implicados. **D:** inserción. Cre inserta un fragmento de ADN si LoxP se encuentra en una secuencia circular y otro en una secuencia lineal.

Cre-LoxP para analizar el papel de proteínas clave en la homeostasis del calcio y la contractilidad cardíaca, como el receptor de rianodina (RyR2) y el intercambiador sodio-calcio (NCX1). La deleción selectiva de estos genes en cardiomiocitos ha proporcionado información esencial sobre su papel en la génesis de arritmias y disfunción cardíaca, lo cual ha permitido el desarrollo de estrategias terapéuticas dirigidas.²

Además, la capacidad de inducir cambios genéticos específicos en cardiomiocitos adultos ha permitido explorar la función de genes involucrados en la remodelación

cardíaca posterior a un infarto y en la respuesta a la presión mecánica elevada, como ocurre en la hipertensión arterial. Estos modelos han sido esenciales para entender los procesos de fibrosis, apoptosis e hipertrofia celular, que son parte de la progresión de diversas enfermedades cardíacas.

Una de las aplicaciones del sistema Cre-LoxP es en el área de la optogenética, donde la finalidad es expresar ciertas proteínas-canal que son sensibles a cierto tipo de luz y de esta forma se modula el cierre o la apertura de los canales afectando la función del

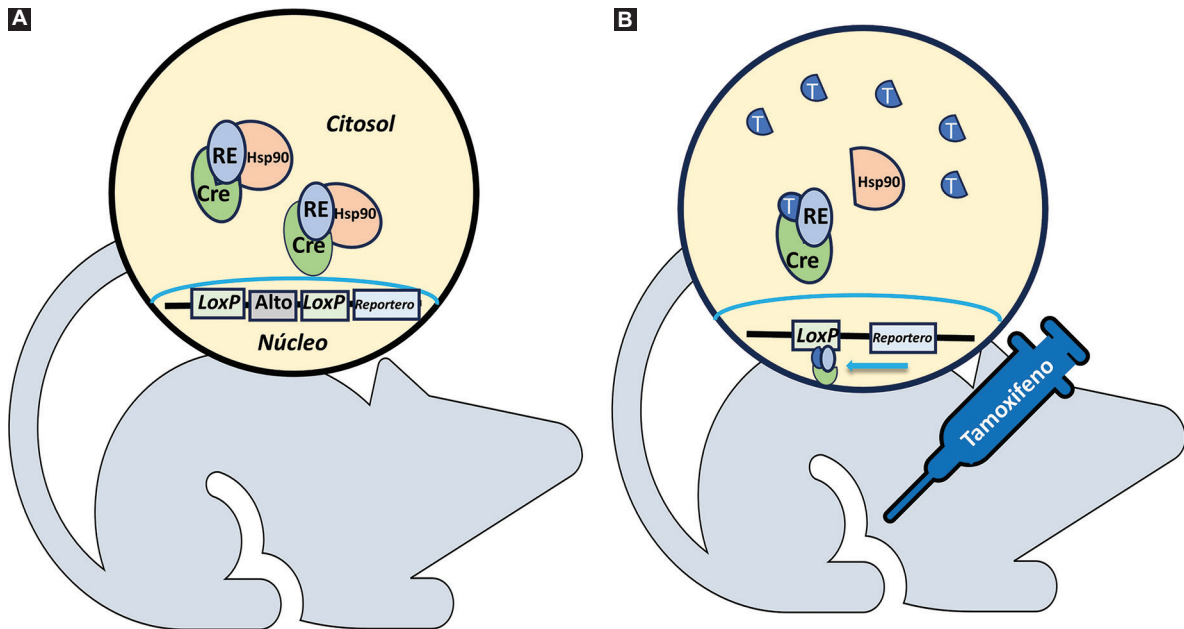


Figura 2. Sistema Cre-LoxP inducido por tamoxifeno. **A:** el complejo de proteínas Cre-RE se encuentra unido a la proteína Hsp90 en el citosol. Dentro del núcleo (encapsulado azul) se encuentra el ADN con los dos sitios Lox-P, y en medio de ellos la secuencia de paro (Alto), la cual mantiene apagada a la proteína reportera (Reportero). **B:** la inyección de tamoxifeno (T) en el peritoneo del ratón hace llegar este medicamento al citosol, en donde produce la separación de la proteína Hsp90 del complejo Cre-RE, permitiendo así la translocación al núcleo del complejo Cre-RE-tamoxifeno (flecha), lo cual permite la eliminación de la secuencia de paro y por ello la consecuente expresión de la proteína reportera.

Tabla 1. Principales características de los sistemas Cre-LoxP, Dre-RoxP, FLPe-FRT y CRISPR-Cas9

Sistema	Tipo de sistema	Sitios de reconocimiento	Ventajas	Limitaciones
Cre-LoxP	Recombinasa específica de sitio	Secuencia LoxP, 34 pares de bases	Especificidad, control temporal, funcionalmente flexible	Posible recombinación cruzada, limitaciones en regulación temporal y espacial
Dre-RoxP		Secuencia RoxP, 34 pares de bases	Especificidad independiente de Cre-LoxP, se puede usar en manipulación de varios sitios en combinación con CreLoxP	Uso menos extendido, sistema de uso más reciente
FLPe-FRT		Secuencia FRT, 24 pares de bases	Complementaria con otros sistemas, menos toxicidad celular	Recombinación no deseada, estabilidad térmica reducida
CRISPR-Cas9	Nucleasas guiadas por RNA	Secuencia PAM y guía de RNA	Alta especificidad, combinación con otros sistemas	Cortes fuera del objetivo, eficiencia variable

tejido u órgano específico. Se recomienda revisar el artículo «La optogenética y sus aplicaciones en cardiología» para información adicional sobre este tema.³

Alternativas a CreLoxP

Otro sistema análogo es FLPe-FRT, el cual utiliza una recombinasa FLP (del inglés *Flippase*) y sitios

para la recombinación de 34 pares de bases llamados FRT (*FLP recombinase target*). Los componentes de este sistema son derivados de levaduras. Se utilizan con mayor frecuencia en *Drosophila melanogaster* y *Caenorhabditis elegans*. En sus inicios, la termolabilidad de la recombinasa era su mayor problema para el estudio en mamíferos, pero recientemente, con la versión FLPe, este problema ha sido superado. La combinación de Cre-LoxP y FLPe-FRT⁴ se ha utilizado

en el estudio de la expresión génica en tejidos durante momentos específicos del desarrollo.

Dre-roxP es un sistema que incluye una recombinasa Dre y sitios roxP (proteína específica producida por la bacteria *Cutibacterium acnes*). Se ha usado en el estudio de la expresión génica controlada. La recombinasa de este sistema proviene de bacteriófagos e incluye una secuencia roxP de 32 pares de bases. Debido a que Cre-LoxP y Dre-roxP utilizan recombinasas diferentes y específicas propias de cada sistema, se pueden utilizar de manera conjunta en estudios de etapas tempranas del desarrollo.⁵ Las principales características se muestran en la Tabla 1.

CRISPR-Cas9: un complemento a este sistema de edición genética

CRISPR-Cas9 es una técnica de edición génica que ha revolucionado la biología molecular por su capacidad de inducir cortes específicos de doble cadena en el ADN mediante una endonucleasa (Cas9) guiada por un ARN de secuencia complementaria al sitio blanco. Esta tecnología permite modificaciones dirigidas en el genoma de manera rápida y eficiente, incluyendo inserciones, deleciones o sustituciones de secuencias específicas.

Aunque Cre-LoxP permite controlar la expresión génica de forma espacio-temporal, requiere insertar previamente sitios LoxP mediante métodos complejos. La combinación con CRISPR-Cas9 facilita esta inserción de manera más rápida y precisa, optimizando la generación de modelos condicionales.⁶ Además, permite mayor flexibilidad experimental, al combinar la edición dirigida de CRISPR con el control inducible de Cre-LoxP, lo cual es especialmente útil en modelos cardiovasculares para estudiar funciones génicas en etapas o condiciones específicas. Algunos estudios han implementado estrategias en cascada que integran CRISPR-Cas9, Cre-LoxP y sistemas adicionales como FLPe-FRT para realizar ediciones genéticas múltiples o controladas por etapas, ampliando aún más el alcance de los modelos experimentales disponibles. Estas aproximaciones han abierto nuevas posibilidades en la investigación funcional y terapéutica en cardiología y otras áreas de la biomedicina.

Desafíos técnicos actuales

A pesar de su poder, el uso del sistema Cre-LoxP presenta desafíos significativos. La expresión

ectópica de Cre, la recombinación no deseada en tejidos no objetivo y la complejidad en la creación y el mantenimiento de líneas transgénicas son obstáculos que requieren consideraciones técnicas rigurosas y controles experimentales robustos. Además, la interpretación de los resultados puede ser complicada debido a la variabilidad en la expresión de la recombinasa y la penetrancia incompleta de las modificaciones génicas.⁷

Conclusión

El sistema Cre-LoxP ha transformado la investigación biomédica, ofreciendo una herramienta potente para el análisis funcional de genes en modelos animales. Su aplicación en la investigación cardiovascular ha proporcionado conocimiento crucial sobre los mecanismos moleculares que subyacen a ciertas enfermedades cardíacas y ha abierto nuevas vías para el desarrollo de terapias dirigidas. A medida que se perfeccionen las técnicas de edición genética, es probable que veamos un impacto aún mayor en la comprensión y el tratamiento de diferentes enfermedades cardiovasculares.

Agradecimientos

A. Totomoch-Serra agradece a la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI) por el apoyo del programa «Estancias Posdoctorales por México» (CVU: 382646).

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

Financiamiento

La SECIHTI financió parcialmente este trabajo (M. F. Márquez-Murillo; CF 2019-376).

Consideraciones éticas

Protección de personas y animales. No aplica (investigación sin experimentación):.

Confidencialidad, consentimiento informado y aprobación ética. El estudio no involucra datos personales, historias clínicas ni muestras biológicas humanas, por lo que no requiere aprobación ética. No se aplican las guías SAGER.

Declaración sobre el uso de inteligencia artificial. Los autores declaran que no se utilizó ningún tipo de inteligencia artificial generativa para la redacción ni la creación de contenido de este manuscrito.

Glosario

Bacteriófago: virus que infecta específicamente bacterias sin afectar a las células eucariotas.

Expresión ectópica: se refiere a la expresión de un gen en tejidos donde normalmente no está programado para expresarse.

Optogenética: técnica que combina biología molecular y física para modificar el comportamiento de grupos celulares mediante la inserción de genes que codifican proteínas sensibles a la luz en células diana. La modulación de la luz permite regular la actividad celular, especialmente en las neuronas.

Penetrancia incompleta: en el contexto de este artículo, se refiere a que ciertas células en determinados tejidos pueden no expresar una mutación insertada, a pesar de ser portadoras y contar con las condiciones necesarias para que dicha expresión ocurra.

Potenciador: región reguladora del ADN que incrementa la tasa de transcripción de uno o varios genes.

Promotor: región del ADN situada antes del inicio de un gen que contiene secuencias específicas donde

se unen proteínas, como los factores de transcripción y la ARN polimerasa, para activar la transcripción del gen.

Recombinasa: enzima que facilita el corte y la unión de segmentos de ADN para permitir el intercambio o el reordenamiento de material genético entre moléculas de ADN.

Secuencia palindrómica: segmento de ADN o ARN cuyas bases se leen igual que su complemento inverso.

Referencias

1. Kim H, Kim M, Im SK, Fang S. Mouse Cre-LoxP system: general principles to determine tissue-specific roles of target genes. *Lab Anim Res.* 2018;34(4):147-59. doi: 10.5625/lar.2018.34.4.147.
2. Bruegmann T, Boyle PM, Vogt CC, Karathanos TV, Arevalo HJ, Fleischmann BK, et al. Optogenetic defibrillation terminates ventricular arrhythmia in mouse hearts and human simulations. *J Clin Invest.* 2016;126(10):3894-904. doi: 10.1172/JCI88950.
3. Totomoch-Serra A, Bazbaz A, Chávez-Canales M, Aceves-Buendía JJ, Márquez MF. MotuCordis. Monterrey (NL), México: ImagenGlobal; 2023. Disponible en: <https://imagenglobal.org.mx/wp-content/uploads/2025/03/WEB-MOTU-14NOV-optimized.pdf>.
4. Hubbard EJ. FLP/FRT and Cre/lox recombination technology in *C. elegans*. *Methods.* 2014;68(3):417-24. doi: 10.1016/j.ymeth.2014.05.007.
5. Chuang K, Nguyen E, Sergeev Y, Badea TC. Novel heterotypic RoX sites for combinatorial Dre recombination strategies. *G3 (Bethesda).* 2015;6(3):559-71. doi: 10.1534/g3.115.025841.
6. Li J, Li Y, Pawlik KM, Napierala JS, Napierala M. A CRISPR-Cas9, Cre-lox, and Flp-FRT cascade strategy for the precise and efficient integration of exogenous DNA into cellular genomes. *CRISPR J.* 2020;3(6):470-86. doi: 10.1089/crispr.2020.0042.
7. Thunemann M, Schörg BF, Feil S, Lin Y, Voelkl J, Golla M, et al. Cre/lox-assisted non-invasive in vivo tracking of specific cell populations by positron emission tomography. *Nat Commun.* 2017;8(1):444. doi: 10.1038/s41467-017-00482-y.