
El cáncer y la terapia génica: ¿qué es CRISPR?



Fuente: <https://medlineplus.gov/spanish/taysachsdisease.html>

Ficha estudiante

Estos materiales didácticos son para uso docente y de investigación. Queda prohibida su comercialización o modificación.

1. Caso clínico. El cáncer y la terapia génica: ¿qué es CRISPR?

Imagina que eres jefe/a del departamento de genética molecular del Hospital Clínic de Barcelona, y solo hace dos días que has empezado este nuevo trabajo. De vez en cuando, te llegan los resultados de un análisis de sangre un poco preocupantes, y decides ir a buscar qué paciente tiene estos análisis. Corresponden a un hombre de 55 años, que llegó al hospital hace unos cuantos días porque se notaba muy cansado y tenía fiebre desde hacía tiempo. Cuando la médica le hizo la exploración física, le encontró un bulto bajo el brazo, en la axila. Estos síntomas preocuparon mucho a la doctora, que le pidió una biopsia de los ganglios linfáticos, el análisis de sangre que te han hecho analizar y otras pruebas de imagen. Finalmente, le hicieron un diagnóstico: linfoma. Y a ti, te piden que ayudes a identificar qué tipo de tumor es y a decidir qué tratamiento sería más efectivo. ¿Crees que podrías usar CRISPR?

- 1- ¿Qué palabras te parecen claves para entender qué tienes que hacer? Márcalas en el texto.
- 2- ¿Hay algún concepto que no entiendas del todo? ¿Qué crees que es?

- 3- ¿Qué sabes de CRISPR, o de la terapia génica?

2. Objetivos

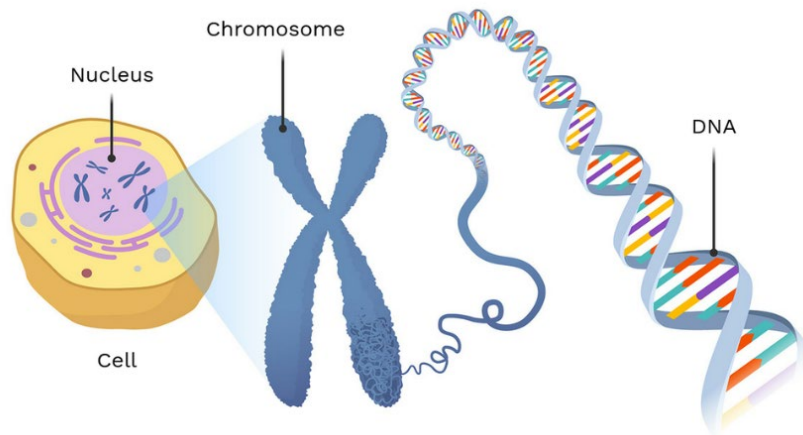
Los objetivos de esta práctica son los siguientes:

- a) Familiarizarse con el linfoma y otros tipos de tumores
- b) Entender cómo funciona el ADN y las translocaciones, principal mutación de los linfomas.
- c) Aprender el funcionamiento de la edición génica por CRISPR-Cas9.
- d) Conocer algunas herramientas bioinformáticas.
- e) Aprender a hacer y analizar un gel de electroforesis.



3. El linfoma y las translocaciones

Nuestro organismo está formado por muchos tipos de células diferentes, que se organizan formando órganos y tejidos, y que nos permiten realizar nuestras funciones vitales. Las células crecen y se dividen de manera controlada gracias al ADN, el material genético que contienen en el interior del núcleo. El ADN es como el libro de los organismos, ya que aporta toda la información necesaria para que las células puedan vivir, crecer y funcionar, y es lo que determinará nuestras características.



Fuente: Django-wiki

El ADN está formado por cuatro nucleótidos: adenina (A), timina (T), guanina (G) y citosina (C), unidos formando la cadena de DNA. Dos cadenas de ADN se unirán de manera complementaria, es decir, la A se une a la T, y la G a la C, y las dos cadenas se enrollarán sobre sí mismas formando una hélice, y a medida que la hélice se vaya condensando, se formarán los cromosomas.

Cuando las células se dividen, el ADN se duplica, de manera que cada una de las copias pase a cada célula hija. Pero este proceso de duplicación del ADN da lugar a errores, también llamados mutaciones. Estos errores son muy abundantes, y la mayoría son corregidos o eliminados por nuestro propio cuerpo. Las alteraciones del ADN pueden ser de dos tipos diferentes:

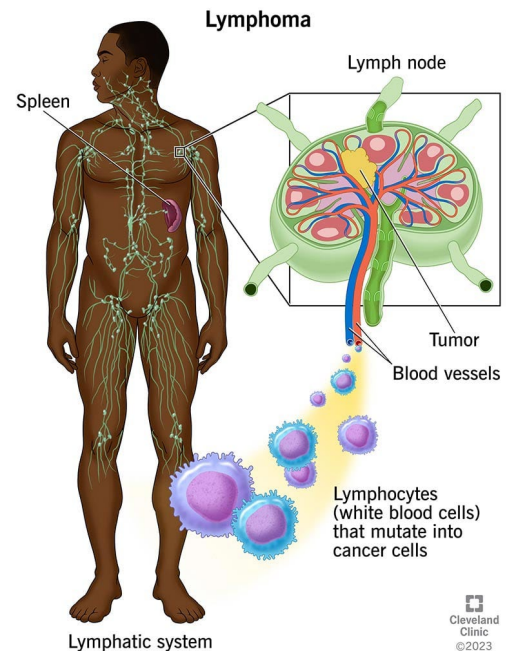
Alteraciones génicas Afectan a un solo gen	Pérdida de función El gen deja de expresarse	
	Ganancia de función El gen se sobreexpresa	
Alteraciones cromosómicas Afectan a una parte del cromosoma	Numéricas Cambian el número de cromosomas	Poliploidía Más de dos cromosomas de un tipo
		Aneuploidía Falta algún cromosoma
	Estructurales Cambian la estructura del cromosoma	Deleciones Se elimina una parte del cromosoma
		Duplicaciones Se duplica una parte del cromosoma
		Inserciones Se inserta una parte de un cromosoma en otro
		Translocaciones Se intercambian dos fragmentos de dos cromosomas diferentes

Cuando nuestro cuerpo no es capaz de corregir o eliminar estas mutaciones, pueden originar un mal funcionamiento de la célula, que las llevará a crecer en exceso y sin control formando lo que llamamos tumor. Los tumores pueden ser:

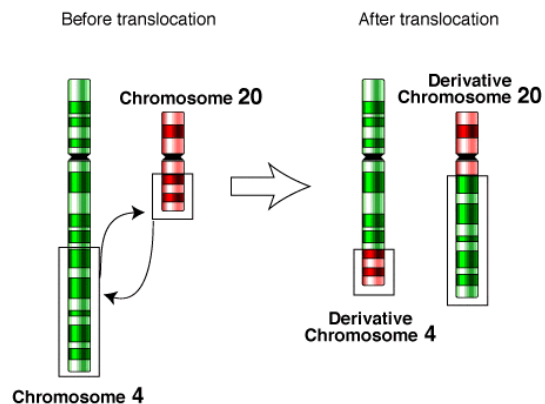
- **Benignos:** las células siguen manteniendo una parte de su identidad célula, y no se diseminarán.
- **Malignos:** las células han mutado tanto que han perdido la identidad celular. También los conocemos como **cáncer**, y tienen la capacidad de diseminarse a otros tejidos, originando metástasis.

Dependiendo de cuáles son las células a partir de las cuales se origina el tumor, podemos encontrar diferentes tipos de cánceres. En el caso del **linfoma**, es un tipo de cáncer que se origina en los **ganglios linfáticos** a partir de los **linfocitos**, que son células del sistema inmunitario. Existen dos tipos de linfocitos, B y T, pero los dos tienen una función en común:

detectar agentes externos a nuestro organismo e iniciar una respuesta inmunitaria contra este.



Los linfocitos tipo B son los encargados de generar **anticuerpos** específicos para detectar y unirse al agente externo que ha entrado en el organismo. Para que los anticuerpos sean específicos, los linfocitos B sufren un proceso llamado **recombinación de la región VDJ**. Esta región está formada por los genes V, D y J, localizados en el cromosoma 14, que se cortan, se deletan y se



insercionan, hasta originar combinaciones únicas. Pero este proceso puede conllevar muchas mutaciones deficitarias para los linfocitos, que hace que no sobrevivan.

Fuente: Wikimedia Commons

En algunos casos, sin embargo, los linfocitos pueden contener mutaciones que los hacen crecer más que el resto de células, y en lugar de morir, crecen descontroladamente generando linfoma. La gran mayoría de linfomas están caracterizados por contener **translocaciones** en sus linfocitos, que son uno de los causantes del desarrollo del tumor.

Dependiendo de qué cromosomas estén involucrados en la translocación, el tipo de linfoma cambiará. Por ejemplo, en el caso del linfoma de células del manto, el cromosoma 14 transloca con el cromosoma 11, que contiene el gen de la Ciclina D1 (CCND1). Este gen se encarga de controlar el ciclo celular, de manera que cuando cambia de lugar y se une al cromosoma 14, el gen CCND1 se empieza a sobreexpresar, y la célula crecerá de forma descontrolada, generando el tumor.

Actualmente existen varias maneras de tratar un tumor como el linfoma: extrayendo el ganglio linfático con una operación, quimioterapia, radioterapia, trasplante de médula ósea, e incluso nuevas terapias dirigidas que luchan directamente contra las células cancerígenas. Aun así, estas terapias no funcionan en todos los casos, y no hay ninguna manera de revertir la mutación o de evitar que vuelva a pasar.

Pero en el año 2012, una serie de avances científicos cambiaron la manera que teníamos de pensar en la genética: el descubrimiento de CRISPR.

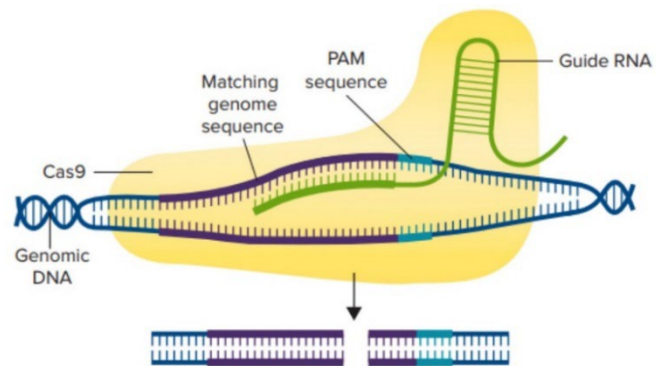
Terapia génica: CRISPR-Cas9

En 2012, Jennifer Doudna y Emmanuelle Charpentier publicaron en la revista *Science* un artículo demostrando cómo CRISPR-Cas9 podía utilizarse como una técnica de ingeniería genética para modificar el ADN. Es decir, con este método se pueden modificar los genes de cualquier animal, incluso los genes humanos.

Pero ¿cómo funciona **CRISPR-Cas9**? La palabra CRISPR proviene de Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats, y hace referencia a unas secuencias de ARN repetitivas que se identificaron en las bacterias, y que les sirve para identificar el ADN de virus y evitar su infección. Las moléculas de ARN se unen a una proteína llamada Cas9, que funciona como unas tijeras. Una vez se ha formado el complejo CRISPR-Cas9, el ARN se une al ADN del virus, y Cas9 lo corta, de manera que consiguen inactivar el virus.

Doudna y Charpentier consiguieron utilizar este método en el laboratorio, para poder detectar y cortar cualquier gen de cualquier organismo. Para hacerlo, necesitamos:

1. Un **ARN guía**: esta molécula contiene una secuencia complementaria al gen que queramos editar. De esta manera, el ARN se puede unir al ADN.
2. La **proteína Cas9**: es la encargada de cortar el ADN, una vez que el ARN guía lleve la proteína hacia el lugar indicado.
3. La **secuencia PAM**: el ARN guía necesita una secuencia de 3 nucleótidos concretos (NGG) para detectar el ADN, que se localicen justo al final de la secuencia complementaria. Sin la secuencia PAM, el ARN guía no se podrá unir al ADN.



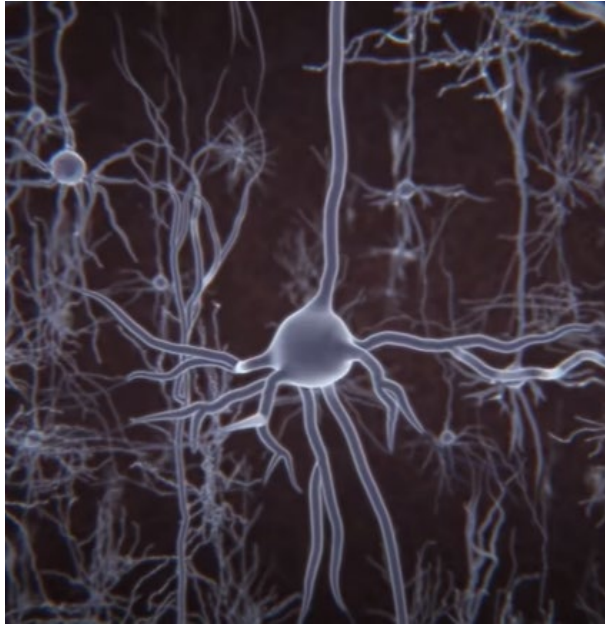
Fuente: <https://www.moleculardevices.com/applications/gene-editing-with-crispr-engineering>

Esta rotura del ADN puede tener diferentes efectos, pero en general, se utiliza para:

- Romper el gen por completo, de manera que queda silenciado y no se expresa.
- Insertar otra secuencia de ADN en el lugar del corte, de manera que modificamos la secuencia del ADN.

A veces, sin embargo, el ARN guía puede unirse a otras regiones del ADN que no es la que habíamos escogido. Esto se llama "off-target effects", y podrían tener consecuencias desastrosas para el organismo. Por lo tanto, todavía no es un sistema del todo seguro, y por ello no se utiliza como tratamiento.

Pero ¿qué podríamos conseguir con CRISPR? ¿Podríamos cambiar las mutaciones y curar el cáncer? ¿Podríamos también cambiar otros genes, para hacernos más fuertes, más inteligentes o para escoger cómo queremos que sea nuestra descendencia? ¿Hasta dónde podríamos llegar? Estos dos vídeos os ayudarán a entender mejor la técnica y sus utilidades.



4. Hipótesis y predicciones

Nuestro paciente tiene linfoma de células del manto, que contiene la translocación t(11; 14) y sobreexpresa el gen de la Ciclina D1 (CCND1). Estos son los tratamientos habituales que se han intentado con el paciente, pero no han funcionado:

Tratamiento	¿Qué es?	Ventajas	Inconvenientes
Quimioterapia	Inyección de medicamentos y otros químicos para destruir rápidamente las células que proliferan, como las cancerígenas. Se puede inocular de manera intravenosa o con píldoras.	Se destruyen todas las células, de manera que eliminaremos el tumor con una alta probabilidad, e independientemente de las mutaciones que contenga.	Por el mismo motivo, como elimina todas las células, tanto las sanas como las tumorales, tendrá muchos efectos secundarios. Tiene una alta toxicidad para el organismo.
Terapia de radiación	Se utiliza rayos de alta energía, como rayos X y protones, para destruir las células cancerígenas por radiación.	Al igual que la quimioterapia, destruirá las células cancerígenas independientemente de sus mutaciones.	Tiene muchos efectos secundarios y no distingue entre células sanas y tumorales.
Trasplante de metálica ósea	Se insertan células madre de la metálica ósea de un donante sano, que reconstruirán la metálica ósea del paciente	Tienen un alto porcentaje de éxito.	Se necesita hacer quimioterapia y/o radioterapia antes para destruir por completo la médula ósea del paciente. Por lo tanto, tendrá también muchos efectos secundarios. Además, se necesita encontrar un donante compatible.
Terapias personalizadas/diana	Son medicamentos que se diseñan específicamente para atacar las células cancerígenas del paciente. Por ejemplo, la inmunoterapia hecha con células CAR-T.	Tienen muy pocos efectos secundarios, porque detectan específicamente las células cancerígenas del paciente. Tienen un alto porcentaje de éxito, pero solo entre los pacientes que tienen una mutación clave.	Son muy caras porque hay que analizar a cada paciente. Son específicas para ciertas mutaciones, de manera que, si algunos pacientes no tienen estas mutaciones, no pueden tratarse con estas terapias.

Sabiendo esto, y ahora que ya entendemos cómo funciona la terapia génica, ¿sería posible utilizarla como tratamiento? ¿Cómo lo haríais?

1. ¿Cómo podríamos usar CRISPR-Cas9 como tratamiento para este tipo de linfoma?

2. ¿Qué elementos necesitaríamos?

3. ¿Qué problemas creéis que podríamos tener?

5. Diseño del experimento

El paciente al que estamos analizando tiene una sobreexpresión del gen CCND1. Para probar un nuevo tratamiento experimental, intentaremos silenciar este gen usando CRISPR-Cas9. Para ello, debemos seguir estos pasos:

- a) **Diseñar los ARN guía.** Uno de los elementos más importantes de CRISPR-Cas9 son los ARN guía. Sin ellos, no podríamos dirigir nuestra terapia al gen de interés, que en este caso es la CCND1. Este diseño se realiza de manera bioinformática.
- b) **Llevar a cabo CRISPR-Cas9.** La terapia génica con CRISPR-Cas9 se hará en un laboratorio externo, porque es muy complicado, con células del paciente que están en cultivo. Al cabo de unas cuantas horas, ya podremos saber si la técnica ha funcionado.
- c) **Extraer el ADN.** Para ver si CRISPR-Cas9 ha funcionado, necesitamos extraer el ADN de las células del paciente. Además, el ADN es demasiado pequeño para verlo a simple vista, de manera que necesitamos hacer una PCR para amplificar el material genético. La PCR es como una máquina fotocopidora que nos permitirá tener el mismo ADN en muchas cantidades. Esto también se hará en un laboratorio externo, y nos llevarán el ADN a nosotros para que analicemos los resultados.
- d) **Hacer un gel de electroforesis.** El ADN no se puede ver a simple vista. Por ello, debemos preparar un gel de agarosa, que es un gel con poros donde las muestras de ADN pueden correr movidas por la corriente eléctrica. Así, las moléculas más pequeñas se moverán más rápido y caerán más abajo del gel, mientras que las más grandes quedarán más arriba. Esto nos permite separar las moléculas de ADN por su tamaño, y ver en cuáles de ellas hemos podido cortar el gen de manera eficiente.

¿Qué resultados esperas obtener y por qué?

6. Protocolo bioinformático

1. Observación del gen CCND1

Para aplicar la técnica de CRISPR, necesitamos diseñar los ARN guía que detecten el gen de la CCND1, con herramientas bioinformáticas. Sigue los siguientes pasos y contesta las preguntas.

1. Abre una ventana de internet y busca **UCSC Genome Browser Home**. Esta página web nos permite visualizar nuestros cromosomas y todos los genes que hay.
2. Arriba a la izquierda, clics en "Genomes" y luego en "Human GRCh38/hg38". Esta es la última versión del ADN humano que se ha secuenciado.
3. En el buscador, escribe "CCND1" y preme a "go". Esto te permitirá encontrar el gen de la ciclina D1 y analizarlo. Contesta las siguientes preguntas sobre este gen:

¿En qué cromosoma está localizado el gen CCND1?

¿Qué longitud tiene este gen? Lo puedes escribir en **bp**, que son pares de bases de nucleótidos.

¿Qué coordenadas tiene la CCND1?

2. Generación de los ARN guía

Una vez que sabemos todo lo necesario sobre el gen de la CCND1, vamos a diseñar 5 ARN guía diferentes, para ver cuál de ellos funciona mejor. Como CRISPR es una técnica con muchos "off-target", tenemos que hacer varias pruebas. Sigue los pasos siguientes y contesta las preguntas a continuación.

1. Abre una ventana de internet y CHOPCHOP (<https://chopchop.cbu.uib.no/>).
2. Escribe el gen diana (**target**), la especie donde queremos hacer CRISPR (humana), qué técnica queremos usar y con qué finalidad (**knock-out**). **Knock-out** significa que queremos suprimir el gen. A continuación, clics en "**Find target sites**".
3. ¿Cuáles son los 5 mejores ARN guía? ¿Qué eficiencia tienen? Comprueba que se localicen en tu gen de interés. ¿Cuál es la secuencia PAM que detecta cada uno de los ARN guía?

Secuencia ARN guía	Eficiencia	Localización	Secuencia PAM

Ahora que ya tenéis los 5 candidatos, esta noche aplicaremos CRISPR-Cas9 en 5 muestras diferentes del paciente, cada muestra con un ARN guía diferente. Después, extraeremos el ADN y lo amplificaremos por PCR en un laboratorio especializado. Al día siguiente por la mañana, os llevaremos las muestras de ADN para que podáis comprobar qué ARN guía han funcionado.

7. Protocolo experimental

El día anterior diseñamos los elementos necesarios para hacer CRISPR-Cas9, y los vamos a enviar a un laboratorio especializado. Este laboratorio aplicó la terapia génica a las células del paciente en cultivo, extrajo su ADN y lo amplificó usando PCR. Ahora, nos devuelve las muestras de ADN amplificado, y nosotros tenemos que analizar cuáles de nuestros ARN guía han funcionado para eliminar el gen CCND1.

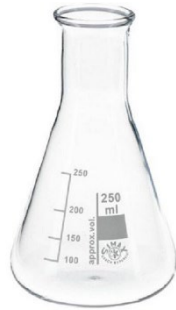
Para ello, utilizaremos el kit EDVOTEK (“Using CRISPR to treat cystic fibrosis”), donde debemos seguir tres pasos: preparar el gel de electroforesis, correr las muestras y teñir el gel para visualizar el ADN. Antes de empezar, sin embargo, ¡ten en cuenta estos puntos!

Puntos a tener en cuenta cuando trabajamos en el laboratorio

1. Tenemos que llevar **guantes y bata** para no quemarnos ni mancharnos con reactivos que pueden ser peligrosos.
2. Debemos vigilar con los elementos que calentamos. Pueden hervir y salpicarnos.
3. Vigile con el equipo eléctrico.
4. Debemos lavarnos las manos y el material del laboratorio a menudo, y sobre todo después de acabar la práctica.
5. ¡Anotad todo lo que pase durante el experimento! Puede ser clave para entender los resultados.

Material

Probeta graduada



Matraz Erlenmeyer



Pipetas



Puntas



Aparato de electroforesis



Cubetas de plástico

Fuente: Lab Comercial, Lab Comercial, Hawach Scientific, AP Medical, Quirumed, Auxilab

Reactivos

Agua destilada

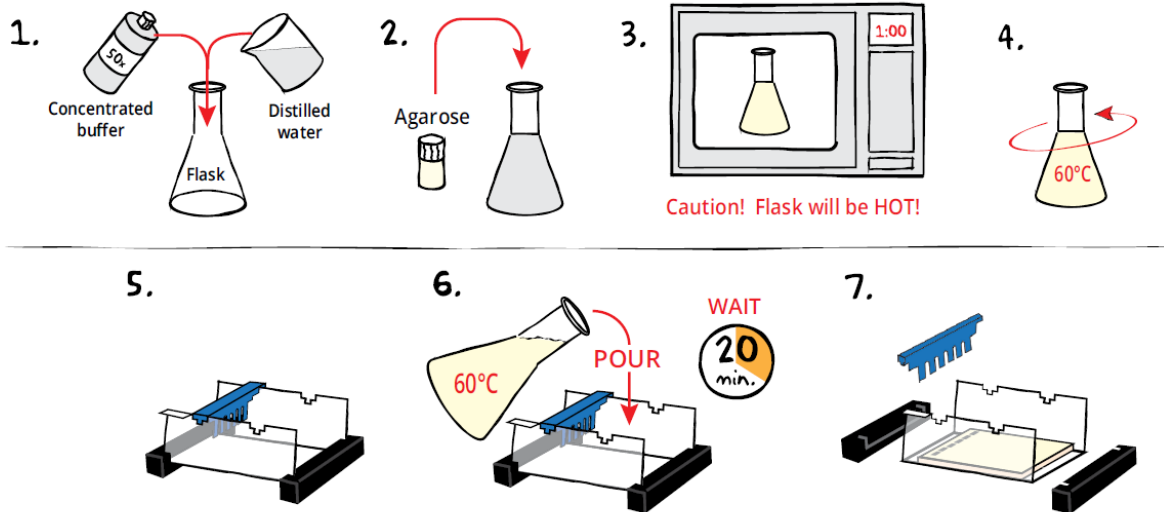
Tampón de electroforesis 50x

Agarosa

Muestras de ADN

Marcador de peso molecular

Tinte FlashBlue 10x

Procedimiento I. Preparación del gel de agarosa

Fuente: Kit Edvotek – “Using CRISPR to treat cystic fibrosis”

Diluye el tampón de electroforesis 50x con agua destilada, hasta que esté a 1x, en una probeta. Necesitaremos 150 ml finales de tampón 1x.

Cálculos

Mezcla la agarosa en polvo con el tampón de electroforesis 1x en un matraz de 250 ml. Ten en cuenta que la agarosa debe tener una concentración final del 0.8%, y el gel tiene un volumen final de 45 ml.

Cálculos

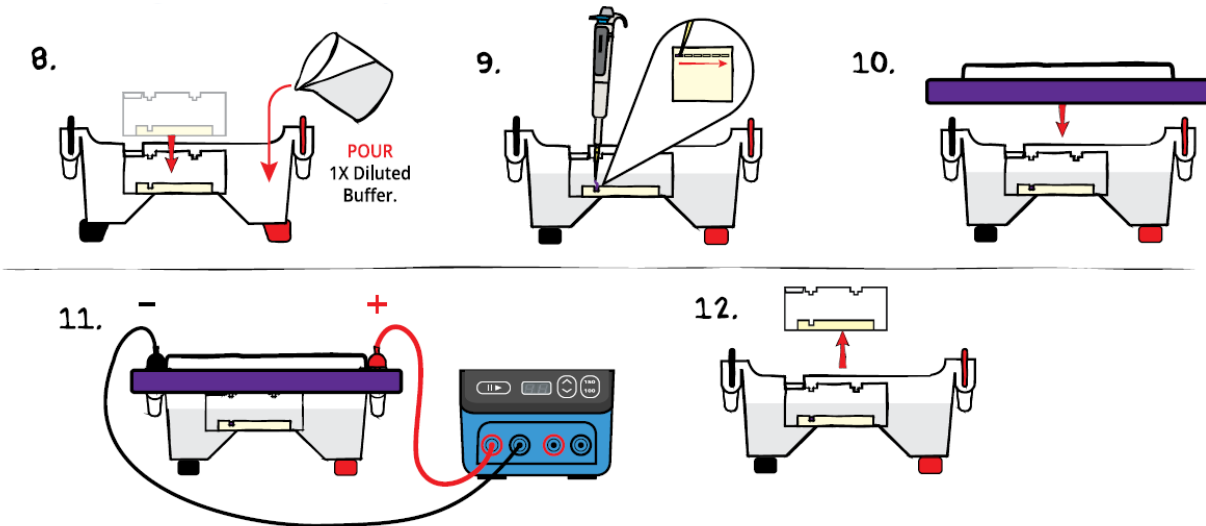
Para disolver la agarosa, hierva la solución poniéndola en el microondas durante 1 minuto. Con cuidado, saca el matraz y revolver. Si no se ha disuelto del todo, continúa calentando la solución durante 15 segundos y repite el proceso hasta que se disuelva toda la agarosa. La solución debería ser transparente como el agua.

Enfría la agarosa hasta los 60°C aproximadamente mientras vamos remendando el matraz.

Mientras la agarosa se enfría, monta la cubeta con los plásticos negros de los extremos bien presionados, y la pinta encima, tal y como se ve en el dibujo.

Vierte la solución de agarosa a la cubeta y déjalo reír por completo. La solución tardará unos 20 minutos en solidificar.

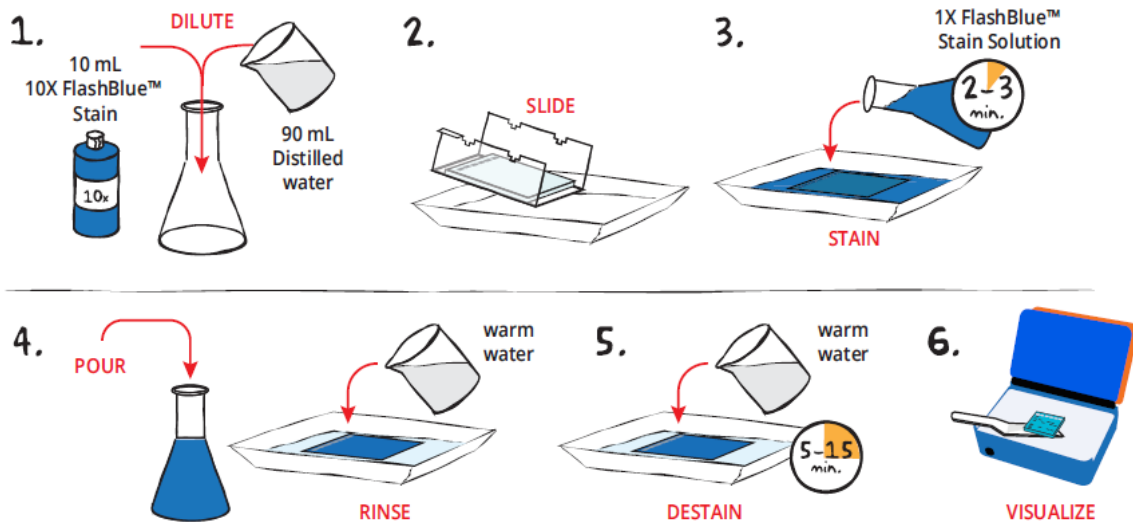
Mientras esperamos que el gel solidifique, iremos preparando el material para el siguiente paso y aprenderemos a usar la pipeta.

Procedimiento II. Electroforesis de las muestras de ADN

Fuente: Kit Edvotek – “Using CRISPR to treat cystic fibrosis”

1. Una vez que el gel ha solidificado, extraemos los plásticos negros y el cepillo de la cubeta. Mantenemos el gel sobre la cámara que lo aguanta para que no se nos rompa.
2. Ponemos el gel en la cámara (aún con el plástico de soporte), y lo cubrimos con tampón de electroforesis 1x hasta que quede todo cubierto.
3. Pipeteamos las muestras individualmente dentro de cada pozo. No hay que sacar la tapa de las muestras, se puede pinchar directamente con la punta de la pipeta. ¡Recuerda cambiar la punta cada vez que cambias de muestra!
4. Pon la tapa de la cubeta y comprueba que la orientación es correcta. El polo negativo (negro) debe quedar en la zona donde has puesto las muestras, ya que estas correrán desde el polo negativo hasta el polo positivo (rojo).
5. Conecta los cables a cada electrodo de la cubeta, también vigilando que los colores sean los adecuados. Inicia la corriente eléctrica entre 100 y 150 voltios (dependiendo del tiempo que tengamos). Veremos que funciona correctamente si vemos burbujas en el tampón, que nos indican que hay corriente eléctrica. ¡Vigila siempre donde están las muestras, que no corran demasiado y salgan del gel!
6. Una vez que la electroforesis se ha completado (más o menos cuando el marcador se encuentra a más de 3 cm del inicio), podemos apagar la corriente eléctrica y sacar el gel de la cámara.

Mientras las muestras corren (entre 10 y 40 minutos), prepararemos los siguientes pasos y hacemos los cálculos.

Procedimiento III. Tinción del gel y visualización de las muestras

Fuente: Kit Edvotek – “Using CRISPR to treat cystic fibrosis”

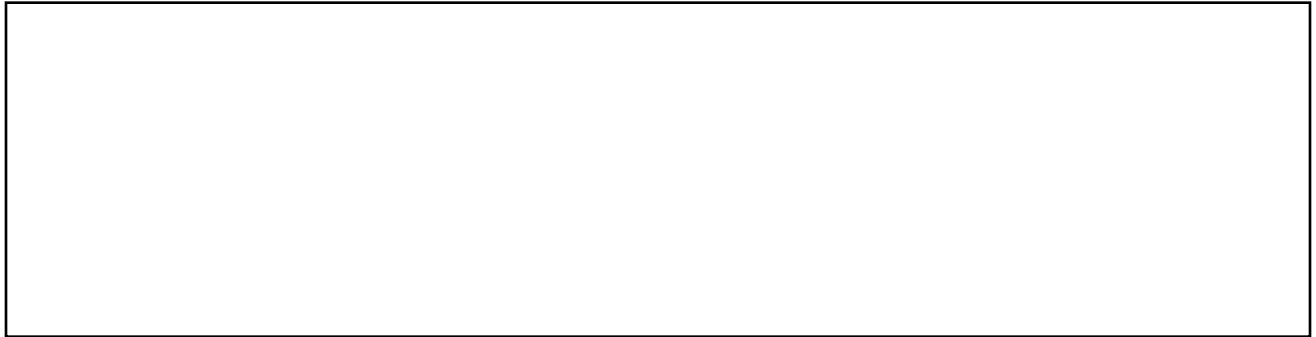
1. Diluimos el tinte del gel (FlashBlue) a 1x con agua destilada. Necesitaremos unos 100 ml de tinte.

Cálculos

2. Extraemos el gel del soporte y lo ponemos en una bandeja limpia.
3. Cubrimos el gel con el tinte 1x durante 2-3 minutos. Para obtener mejores resultados, podemos colocar la bandeja en una balanza en movimiento, o irla agitando nosotros.
4. Al cabo de 3 minutos como máximo (si lo dejamos más tiempo, necesitaremos más tiempo para desteñirlo), colocamos el tinte al matraz para reutilizarlo. Cubrimos la bandeja con agua tibia (40-45°C) y lo dejamos durante 20-30 segundos.
5. Cambiamos el agua por agua limpia y tibia también, y lo dejamos entre 5 y 15 minutos mientras la agitamos. Podremos observar las bandas de ADN a partir de los 5 minutos. Si cambiamos el agua a menudo y lo agitamos, mejoraremos los resultados.
6. Extraemos el gel con mucha cautela y observamos las bandas a contraluz. Si ponemos una linterna o un sistema de luz blanca, las podremos ver mejor.

8. Interpretación de los resultados

1) Dibuja o copia una fotografía de los resultados que hemos obtenido.



2) ¿Qué crees que quiere decir cada resultado? ¿Qué ARN guía usarías?



3) ¿Crees que funcionaría este método como tratamiento del linfoma? ¿Por qué crees que no se utiliza este método para curar cualquier tipo de cáncer?



4) Ahora, en grupos, debatiremos sobre las ventajas y los inconvenientes de la terapia génica.



¿Qué ventajas creéis que tiene la terapia génica?

¿E inconvenientes?

Escribe la conclusión de vuestro grupo y otras ideas interesantes.