
Uso del sistema CRISPR para el tratamiento de la fibrosis quística



[Fuente](#)

Ficha estudiante

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

1. Caso clínico. ¿La fibrosis quística y la terapia génica con CRISPR?

Imagina que eres un/una consejero/a genético/a del Hospital del Mar de Barcelona, y hace unas semanas que has comenzado este nuevo trabajo. Entre tus tareas diarias está la revisión de los resultados de muestras de cribado neonatal, también conocida como la prueba del talón. Entre los resultados de los diferentes bebés que revisas hoy, encuentras un bebé, de sexo masculino, positivo en una de las 24 enfermedades de las que se hace cribado con esta prueba, la fibrosis quística. Como el recién nacido puede ser portador pero no padecer la enfermedad, decides pedir una segunda muestra del paciente para perfilar el diagnóstico. Con la segunda muestra, se secuencian el gen asociado a la fibrosis quística, el *CFTR* (Conductancia Transmembrana de la Fibrosis Quística), para ver si, efectivamente, está mutado y el bebé padece la enfermedad o simplemente es portador. La secuenciación pone en evidencia que el bebé presenta una delección de un segmento de 601 pares de bases en el exón 13 del gen *CFTR*. ¿Crees que podrías usar el sistema CRISPR como terapia génica para este paciente?

1. ¿Qué palabras te parecen clave para entender lo que debes hacer? Márcalas en el texto.
2. ¿Hay algún concepto que no entiendas del todo? ¿Qué piensas que es?

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

2. Objetivos

Los objetivos de esta práctica son los siguientes:

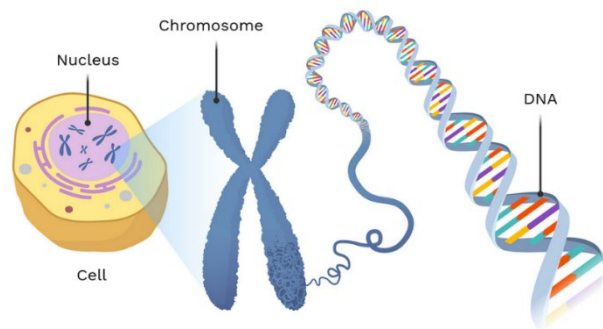
- a) Familiarizarse con el cribado neonatal.
- b) Entender cómo funciona el ADN, las mutaciones y las enfermedades congénitas.
- c) Aprender el funcionamiento de la edición génica por CRISPR-Cas9.
- d) Aprender a realizar una electroforesis de ácidos nucleicos en gel de agarosa.
- e) Analizar los resultados y extraer de estas conclusiones científicas.



3. Las enfermedades congénitas y el cribado neonatal

El ADN y las mutaciones¹

Nuestro organismo está formado por muchos tipos de células diferentes, que se organizan formando órganos y tejidos, y que nos permiten hacer 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. Cuando nuestro cuerpo no es capaz de corregir o eliminar estas mutaciones, pueden originar un mal funcionamiento de la célula.

Las mutaciones del ADN pueden ser de tres tipos diferentes:

Mutaciones génicas Alteración de la secuencia de nucleótidos de un gen	Pérdida de función El gen deja de expresarse	
	Ganancia de función El gen se sobreexpresa	
Mutaciones cromosómicas (o estructurales) Alteran un fragmento concreto del cromosoma	Deleciones Se elimina una parte del cromosoma	
	Duplicaciones Se repite una parte del cromosoma	
	Inversiones Se cambio el sentido de un fragmento en el cromosoma	
	Translocaciones Cambio de posición de un segmento del cromosoma. Puede tener lugar en un mismo cromosoma (translocación) o entre dos cromosomas no homólogos (translocación recíproca).	
Mutaciones genómicas (o numéricas) Alteran el número total de cromosomas. Los humanos tenemos dos copias de cada cromosoma ($2n = 46$), pero la dotación haploide es $n=23$.	Aneuploidía Alteración en el número normal de cromosomas.	Nulisomías Monosomías Tisomías Tetrasomías
	Euploidía Alteración en el número normal de dotaciones haploides (juegos de cromosomas).	Monoploidía Individuos con una única dotación cromosómica ($n = 23$)
		Poliploidía Individuos con más de dos juegos completos de cromosomas ($3n = 69$)

La prueba del talón²

El cribado neonatal o prueba del talón es una herramienta para detectar, diagnosticar y tratar precozmente algunos trastornos genéticos y/o endocrinos muy poco frecuentes que pueden estar presentes en el nacimiento, aunque el bebé no presente síntomas. La prueba del talón se realiza, idóneamente, 48 horas después del nacimiento del bebé y consiste en un pinchazo superficial en el talón para extraer unas gotas de sangre que se impregnan en un papel absorbente.

El cribado puede detectar hasta 24 enfermedades en las que una actuación rápida cambiará el pronóstico, pero también niños portadores sanos de la enfermedad, que tienen alguna alteración genética relacionada y no la desarrollarán. El cribado se hace por la **fibrosis quística**, el hipertiroidismo congénito, la fenilcetonuria y otros cinco trastornos del metabolismo de los aminoácidos, ocho trastornos del metabolismo de los ácidos orgánicos, seis trastornos del metabolismo de los ácidos grasos, la enfermedad de células falciformes y la inmunodeficiencia combinada grave. Actualmente, solo cuidan algunas de estas enfermedades, en el resto un tratamiento precoz evita o reduce los síntomas y lesiones.

La mayoría de las veces el resultado de la prueba es normal, pero en caso de que no lo sea se suele solicitar una segunda muestra para completar el proceso de detección y conseguir un diagnóstico preciso. Es decir, determinar si el bebé es solo portador o si tiene la enfermedad y, en caso de presentarla, cuál es la mutación que lleva asociada.

La fibrosis quística

La **fibrosis quística (FQ)** es una enfermedad rara, crónica, hereditaria y degenerativa que afecta, principalmente, a los pulmones y al sistema digestivo. Es más frecuente en poblaciones de origen europeo (o caucásico). En España, encontramos un caso por cada 5.000 nacimientos, pero uno de cada 35 habitantes son portadores sanos de la enfermedad.^{2,3} En el estado hay 2.500 personas afectadas con FQ, 53% hombres y 47% mujeres.

Los individuos afectados presentan un **espesamiento y disminución del contenido de agua, sodio y cloro en las secreciones y mucosidades del aparato respiratorio, digestivo y reproductor**. Esto hace que les sea mucho más fácil la acumulación de bacterias y pequeños organismos que entran en los pulmones, y que provoquen infecciones e inflamación que pueden llegar a destruir regiones de estos órganos.

La FQ es una enfermedad genética **autosómica recesiva**. El responsable de esta enfermedad es la mutación del gen regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (**CFTR**), localizado en el cromosoma 7. El gen *CFTR* codifica una proteína que forma parte de los canales de cloro de las células epiteliales. Debido a la mutación, los iones de cloro no pueden salir de la célula. Esto afecta al equilibrio hidroelectrico en el exterior e interior de la célula y provoca la presencia y acumulación de un moco espeso que puede obstruir, entre otras, las vías respiratorias. Al mismo tiempo también puede afectar a la producción de sudor (piel salada) y de los fluidos digestivos (peso bajo y problemas digestivos), así como problemas de crecimiento, fertilidad y reducción de la esperanza de vida.

La media de supervivencia actual de las personas afectadas de FQ es de 47,4 años³, este ha aumentado significativamente gracias al cribado neonatal y a los avances clínicos. A pesar de que actualmente no existe una cura para la fibrosis quística, el tratamiento puede aliviar los síntomas, reducir las complicaciones y mejorar la calidad de vida de los pacientes. Entre ellos, existe la terapia génica para corregir la mutación que causa la enfermedad, así como otros medicamentos para tratar la sintomatología de la enfermedad, así como la inflamación y las infecciones subyacentes.

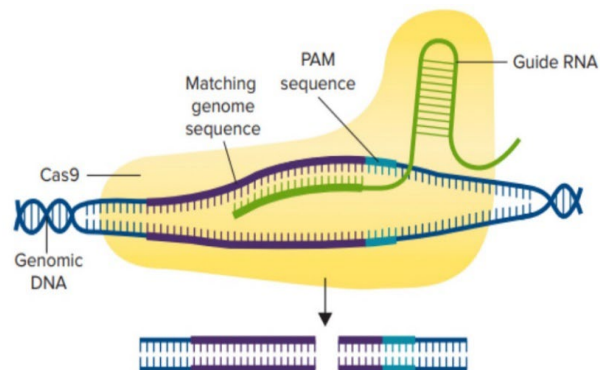
Terapia génica: CRISPR-Cas9¹

En 2012, Jennifer Doudna y Emmanuelle Charpentier publicaron en la revista *Science* un artículo demostrando cómo el sistema 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.

¿Qué es el sistema CRISPR-Cas? La palabra CRISPR proviene de «Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats», que representan secuencias cortas palindrómicas y bien organizadas que se identificaron en las bacterias, y contienen fragmentos de virus que han infectado a las bacterias previamente, y que se almacenan en los fragmentos de ADN espaciador. Al mismo tiempo, disponen de genes que codifican para enzimas nucleasas, llamadas Cas, que actúan como unas «tijeras» encargadas de destruir material genético foráneo. Así pues, las bacterias usan el CRISPR/Cas como sistema inmunitario adaptativo contra agentes externos virales. Ante un nuevo ataque vírico similar, al preservar secuencias víricas de ataques anteriores, pueden identificar el ADN del virus y una vez formado el complejo CRISPR/Cas, gracias a la acción de la Cas, destruirlo rápidamente para evitar su infección.

¿Cómo funciona la técnica de modificación genética CRISPR/Cas? Doudna y Charpentier consiguieron utilizar este método para su uso en el laboratorio, para poder detectar específicamente y modificar cualquier gen de cualquier organismo. Para ello, necesitamos:

1. Un **ARN guía**: esta molécula contiene una secuencia nucleotídica de ARN complementaria al gen que queremos editar. De esta manera, el ARN se puede unir al ADN.
2. La **proteína Cas9**: es una endonucleasa encargada de cortar el ADN, una vez el ARN guía reclute la proteína hacia el lugar indicado.
3. La **secuencia PAM**: el ARN guía necesita reconocer la secuencia PAM, una secuencia de 3 nucleótidos concretos (NGG) en el ADN que se localicen justo al final de la secuencia complementaria, y pues la Cas9 efectuará un corte de doble cadena. Sin la secuencia PAM, el ARN guía no se podrá unir al ADN, y el corte no tendrá lugar.



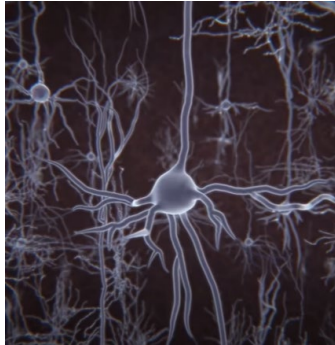
Fuente: <https://www.moleculardevices.com/applications/gene-editing-with-crispr-engineering>

Este corte de doble cadena del ADN puede tener diferentes efectos, pero en general, se utiliza para:

- Silenciar un gen, y evitar que se exprese.
- Modificar la secuencia génica: gracias a los mecanismos de reparación del ADN, tras realizar un corte, pueden insertar otra secuencia de ADN y expresar un nuevo gen.

De todas maneras, el ARN guía puede unirse a otras regiones del ADN que no son la que habíamos escogido. Esto se llama "off-target effects", y pueden tener consecuencias desastrosas para el organismo. Por lo tanto, todavía no es un sistema del todo seguro.

CRISPR/Cas se ha convertido en una herramienta de ingeniería genética se puede programar para que haga cortes específicos en la región genómica de interés para tratar enfermedades, generar modelos y estudiar dianas de nuevos fármacos. Sin embargo ¿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 escoger cómo queremos que sea nuestra descendencia? ¿Hasta dónde podríamos llegar?

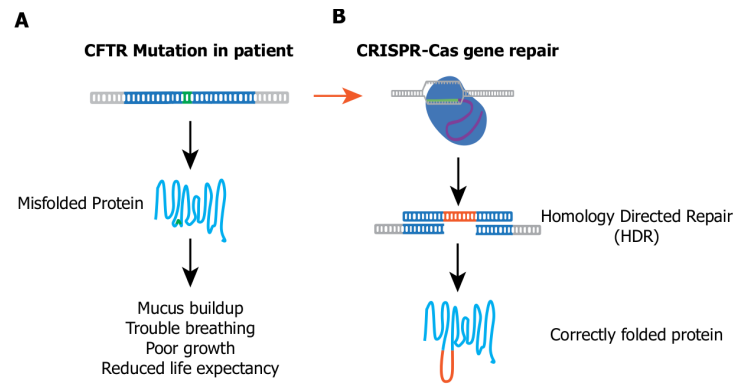


4. Diseño del experimento

El contenido de este taller experimental se ha creado en base al material proporcionado en el [KIT Using CRISPR to Treat Cystic Fibrosis \(Edvo-Kit#135\)](#), from EDVOTEK

Con el diagnóstico específico para nuestro paciente, los facultativos se plantean llevar a cabo terapia génica con CRISPR-Cas9 en este paciente con el objetivo de corregir la mutación que le está causando la enfermedad. Pero, antes de poder actuar a nivel de paciente, hay que realizar muchos experimentos para ver si es factible y asegurar que no causa ningún efecto secundario.

En este experimento, ayudaréis al personal del hospital a llevar a cabo las validaciones necesarias para evaluar la viabilidad de la terapia. Concretamente, se diseñarán diferentes ARN guía (gRNA) para dirigir la terapia en la región del gen *CFTR* donde el paciente presenta la delección, y se evaluará la especificidad de cada uno de ellos con el fin de encontrar el mejor gRNA candidato.



Fuente: [KIT Using CRISPR to Treat Cystic Fibrosis \(Edvo-Kit#135\), from EDVOTEK](#)

Para realizarlo, tenemos que seguir estos pasos:

1. **Diseñar los ARN guía.** Uno de los elementos más importantes de la terapia génica con CRISPR-Cas9 son los ARN guía. Sin estos, no podríamos dirigir nuestra terapia al gen de interés, que en este caso es el gen *CFTR* (exón 13), en una región concreta de 4.300 pares de bases (pb), donde el paciente presenta la delección de 601 pb.
2. **Llevar a cabo los experimentos de CRISPR-Cas9.** La terapia génica con CRISPR-Cas9 se realizará en un laboratorio externo con células del paciente que están en cultivo, y estas se enviarán de nuevo a nuestro laboratorio.
3. **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 realizar una PCR para amplificar el material genético. La PCR es como una máquina fotocopidora que nos permitirá tener el mismo ADN en grandes cantidades. Esto también se realizará en un laboratorio externo y nos llevarán el ADN a nosotros para que analicemos los resultados.
4. **Preparar un gel de electroforesis de agarosa, correrlo y teñirlo.** El ADN no se puede ver a simple vista. Por eso, debemos preparar un gel de agarosa, que es una matriz porosa donde las muestras de ADN pueden avanzar movidas por la corriente eléctrica y separarse en función de su tamaño. Así, las moléculas más pequeñas se moverán más rápido y llegarán más abajo del gel, mientras que las mayores quedarán más arriba. Esto nos permitirá deducir en cuáles de ellas hemos podido cortar el gen de manera eficiente basándonos en la velocidad de migración y tamaño de los fragmentos.

¿Qué resultados esperas obtener y por qué?

Seguridad en el laboratorio

1. Hay que llevar guantes y gafas de protección.
2. Trabaja con mucha precaución con los equipos que impliquen el uso conjunto de temperatura elevada y/o fusión de reactivos.
3. Vigila al utilizar cualquier equipo eléctrico del laboratorio.
4. Hay que lavarse siempre las manos con jabón y agua tras manipular reactivos o materiales biológicos en el laboratorio.

Es importante documentar todo lo que sucede durante un experimento, incluyendo las condiciones experimentales, los pensamientos y las observaciones, así como los datos recopilados y los resultados obtenidos.

- Antes de comenzar el experimento: lee con cuidado la introducción y el protocolo. Utiliza esta información para formar una hipótesis para este experimento.
- Durante el experimento: registra tus observaciones y resultados.
- Después del experimento: interpreta los resultados y extrae sus conclusiones.

Módulo I: diseño el gRNA para dirigirse al gen CFTR

En este módulo, diseñaréis el ARN guía (gRNA) utilizando los datos de secuenciación de ADN de un paciente que presenta una deleción en su gen *CFTR*. Esta mutación elimina un segmento de 601 pb del exón 13, inactivando completamente la proteína CFTR.

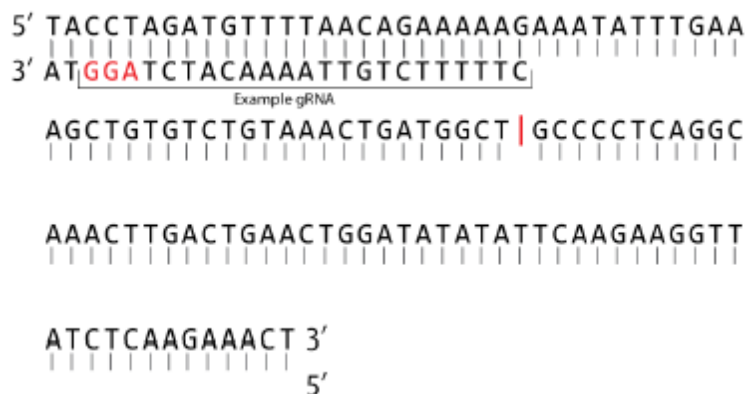
Para diseñar el gRNA, hay que identificar primero los puestos PAM en la secuencia diana. Para este experimento, supone que se utiliza una enzima Cas9 de *Streptococcus pyogenes*, que usa un sitio PAM "NGG". En esta notación, la "N" puede ser cualquier nucleótido. Esto significa que la proteína Cas9 sólo se podrá unir a secuencias inmediatamente up-stream (en la dirección 5') de una secuencia AGG, TGG, CGG o GGG. Como la Cas9 puede unirse a cualquiera de las dos cadenas de ADN complementarias, es necesario examinar ambas cadenas para posibles secuencias.

En el gRNA guía de ejemplo, la secuencia PAM es "AGG", situada en la cadena antisentido. Por lo tanto, la secuencia diana es la de 20 nt en la dirección 5' del puesto PAM.

1. Fíjate en los nucleótidos complementarios en la secuencia del gen *CFTR*. Algunas partes de la secuencia complementaria ya se han rellenado (etiquetadas como "Ejemplo de gRNA").

Nota: el carácter rojo "I" indica el lugar de deleción de nuestro paciente, pero la secuencia de ADN que presenta es una cadena continua.

2. Identifica en la secuencia de ADN 5 lugares PAM para la Cas9 de *Streptococcus pyogenes*, y márcalos.



Fuente: [KIT Using CRISPR to Treat Cystic Fibrosis \(Edvo-Kit#135\), from EDVOTEK](#)

3. Finalmente, identifica los 20 nucleótidos *up-stream* (en la dirección 5') de cada lugar PAM. Esta es la secuencia diana, que hay que escribir en la tabla siguiente:

Nombre del gRNA	Secuencia diana (5' → 3')	Secuencia PAM
Ejemplo	CTTTTTGTAAACATCT	AGG
gRNA#1		
gRNA#2		
gRNA#3		
gRNA#4		
gRNA#5		

Módulo II: electroforesis en gel de agarosa

En este módulo, utilizaréis la electroforesis en gel para analizar la eficacia de 5 gRNA diferentes que se han diseñado. Se obtuvo el ADN del paciente y se amplificó un segmento de **4.300 pb** mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). A continuación, el ADN amplificado se mezcla con la proteína Cas9 y una de las 5 soluciones de gRNA. Si el gRNA puede dirigirse con éxito al gen *CFTR*, será cortado por la enzima Cas9, y mediante la electroforesis en gel, se deberían poder ver dos bandas diferentes (si no corta, en cambio, sólo veremos una de ellas).

Preparación del gel de agarosa

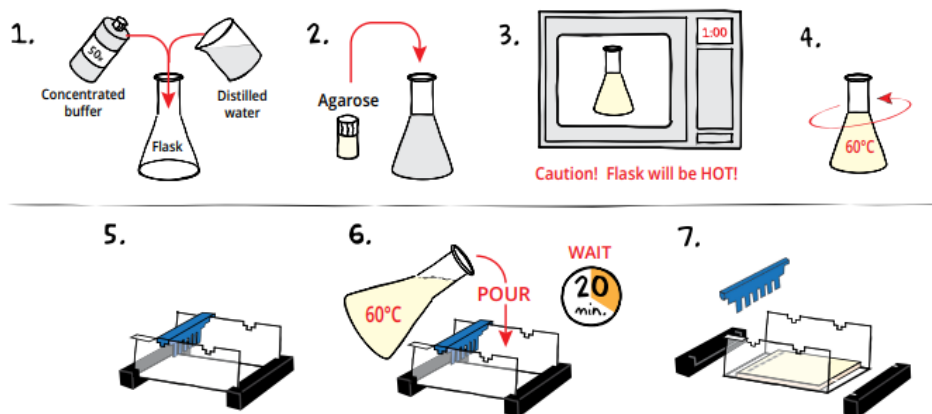
1. DILUYE el **tampón de electroforesis** concentrado 50X con agua destilada (queremos conseguir una concentración final 1X).

Volumen total (ml)	Tampón concentrado 50X (ml)	Agua destilada (ml)
150 ml		

2. Para obtener **gel de agarosa al 0,8%** (0,8 g/100 ml), MEZCLA el polvo de agarosa con la solución de tampón de electroforesis en un matraz de Erlenmeyer de 250 ml.

Tampón de electroforesis 50X (ml)	Agua destilada (ml)	Masa de agarosa (g)	Volumen TOTAL (ml)
			45 ml

3. **DISUELVE** el polvo de agarosa calentando la solución en el microondas a potencia máxima durante 1 minuto. Con cuidado, **SACA** el matraz de Erlenmeyer del microondas y remueve. Sigue **CALENTANDO** la solución en intervalos de 15 segundos hasta que la agarosa esté completamente disuelta (la solución tiene que ser clara como el agua).
4. **ENFRÍA** la agarosa removiendo con cuidado para disipar el calor uniformemente.
5. Mientras la agarosa se enfría, **CIERRA** bien los extremos de la bandeja para colocar el gel con las cajas de goma. **COLOCA** el peine con 5 pocillos en el lugar adecuado.
6. **VACÍA** la solución de agarosa enfriada en la bandeja preparada para colocar el gel. El gel debe endurecerse completamente al cabo de 20 minutos y se volverá menos transparente a medida que se solidifique.
7. Con mucho cuidado, **SACA** el peine de los pocillos y los extremos de gel.



Fuente: [KIT Using CRISPR to Treat Cystic Fibrosis \(Edvo-Kit#135\), from EDVOTEK](#)

Correr el gel

8. **COLOCA** el gel (todavía en la bandeja) dentro de la cámara de electroforesis. **CUBRE** el gel con el tampón de electroforesis 1X, asegúrate de que esté completamente sumergido.

Volumen total (ml)	Tampón concentrado 50X (ml)	Agua destilada (ml)
1.000 ml		

Recordatorio: Antes de cargar las muestras, asegúrate de que está bien orientado dentro del aparato.

9. Tras poner una punta en la pipeta, coge toda la muestra (35 μ L) del QuickStrip™, y CÁRGALA en el pozo en el orden indicado a continuación:

Carril 1	Tubo A	Marcador de peso molecular
Carril 2	Tubo B	gRNA #1
Carril 3	Tubo C	gRNA #2
Carril 4	Tubo D	gRNA #3
Carril 5	Tubo E	gRNA#4
Carril 6	Tubo F	gRNA #5

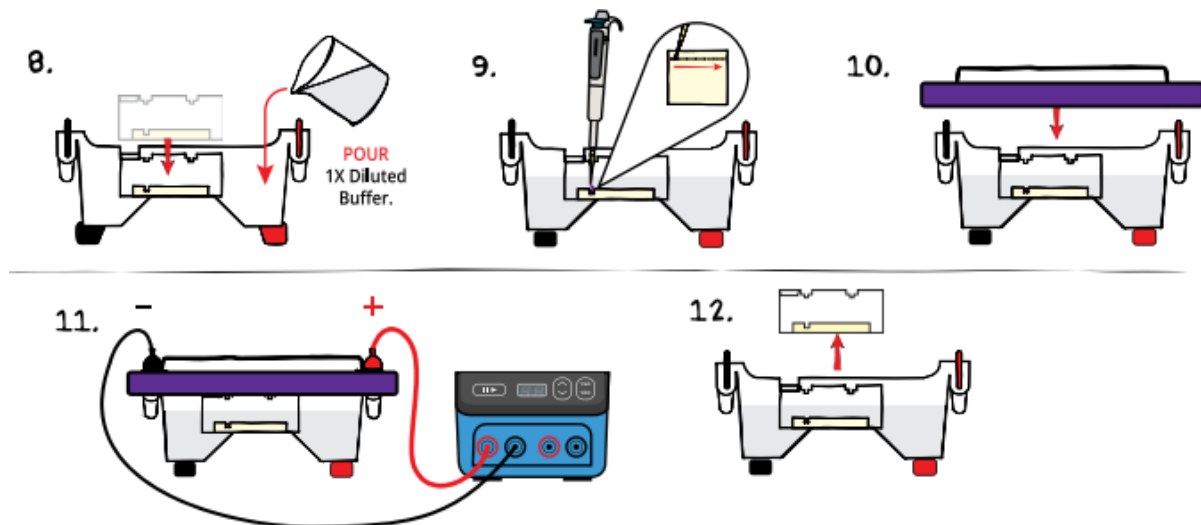
10. COLOCA la cubierta de seguridad en la unidad y COMPRUEBA que el gel esté orientado correctamente.

11. CONECTA los cables a la fuente de alimentación para que comience la electroforesis y hasta que el frente (colorante de seguimiento) migre al menos 30 cm desde los pozos.

VOLTAJE: 150V | TIEMPO: ~ 20/30 minutos

RECORDATORIO: Las muestras de ADN migrarán hacia el electrodo positivo (rojo).

12. Una vez haya finalizado la electroforesis, SACA el gel y la bandeja de colocación de la electroforesis de la cámara.



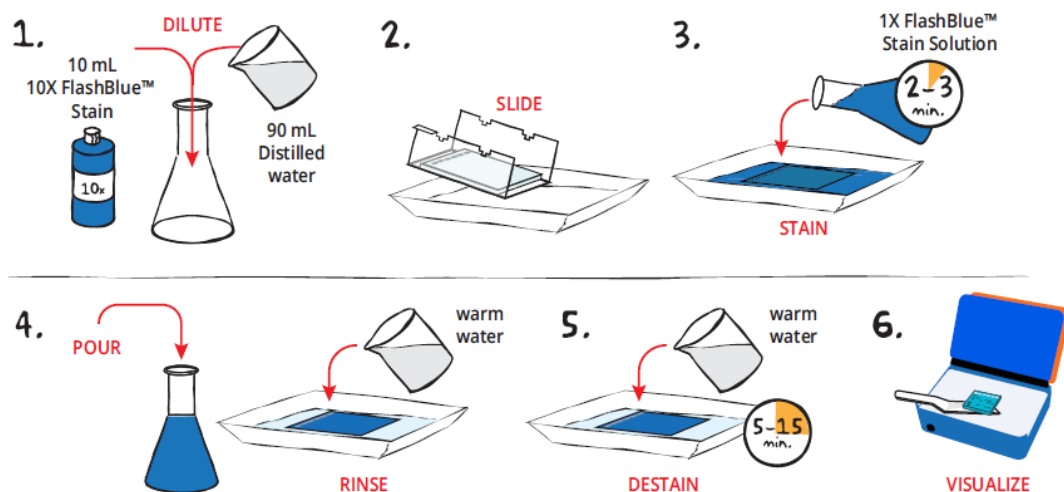
Fuente: [KIT Using CRISPR to Treat Cystic Fibrosis \(Edvo-Kit#135\), from EDVOTEK](#)

Módulo III: tinción de los geles de agarosa con FlashBlue™

1. DILUYE 10 ml de FlashBlue™ concentrado 10X con 90 ml de agua destilada en un matraz de Erlenmeyer para alcanzar FlashBlue™ a una concentración final 1X.
2. Saca el gel fuera de la bandeja y colócalo en una bandeja pequeña y limpia para teñir geles.
3. CUBRE el gel con la solución de tinción FlashBlue™ 1X, durante 2-3 minutos.
4. CUBRE el gel con agua caliente (40-45 °C), LAVALO suavemente durante 20-30 segundos. Después, VACÍA el agua sucia.
5. CUBRE el gel con agua caliente (40-45 °C). DESTIÑE durante 5-15 minutos con agitación suave. Las bandas de ADN empezarán a aparecer después de 5 minutos de desteñir.

NOTA: Cambiar el agua frecuentemente acelerará su almacenamiento.

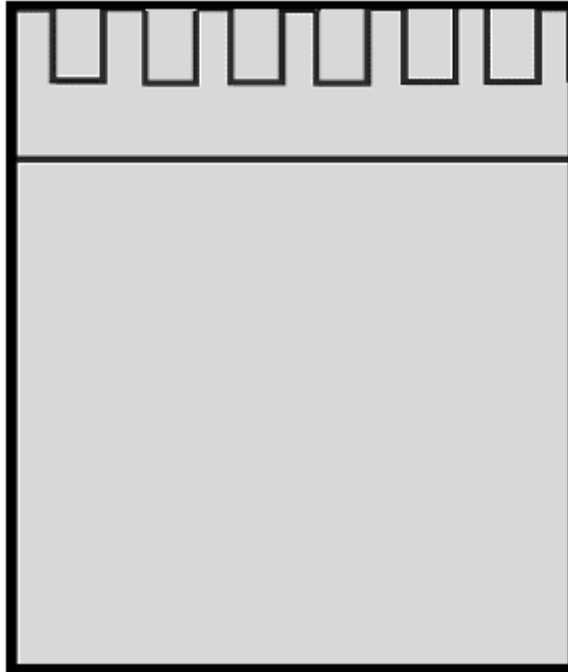
6. SACA con cuidado el gel líquido de desteñir. VISUALIZA los resultados utilizando un sistema con luz blanca. El ADN aparecerá como bandas azules oscuras sobre un fondo azul.



Fuente: [KIT Using CRISPR to Treat Cystic Fibrosis \(Edvo-Kit#135\)](#), from EDVOTEK

5. Resultados, análisis y conclusiones

A continuación, completa el esquema del gel de electroforesis con los resultados observados:



Carril	Muestra + gRNA	Resultado	Peso molecular (bp)
1	Marcador de peso molecular	----	----
2	gRNA #1		
3	gRNA #2		
4	gRNA #3		
5	gRNA #4		
6	gRNA #5		

- En función de estos resultados, ¿cuáles son los mejores candidatos de gRNA para dirigirse a la región del gen *CFTR* del paciente que contiene la delección de 601 pb en el exón 13?

- ¿Cuál sería el siguiente paso a realizar por parte de los médicos y/o médicas?