



Universidad de Valladolid

FACULTAD DE MEDICINA
GRADO EN INGENIERÍA BIOMÉDICA
CURSO ACADÉMICO 2023-2024

TRABAJO FIN DE GRADO

“Generación de modelos celulares de enfermedad mitocondrial mediante la herramienta CRISPR/Cas9”

Roberto Martín Gutiérrez

Tutor: Miguel A. de la Fuente García

Co-Tutora: María Jesús Esteban Amo

Departamento de Biología Celular, Genética, Histología y Farmacología

TÍTULO: Generación de modelos celulares de enfermedad mitocondrial mediante la herramienta CRISPR/Cas9.

TITLE: Generation of mitochondrial disease cell models using the CRISPR/Cas9 tool.

AUTOR:

D. Roberto Martín Gutiérrez

TUTORES:

D. Miguel A. de la Fuente García

D.^a María Jesús Esteban Amo (Co-Tutora)

DEPARTAMENTOS:

Departamento de Biología Celular, Genética, Histología y Farmacología

GRUPO DE INVESTIGACIÓN:

Modificación Génica Dirigida

TRIBUNAL:

PRESIDENTE: D. Juan José Tellería Orriols

SECRETARIO: D.^a Raquel Almansa Mora

VOCAL: D. Miguel Ángel de la Fuente García

SUPLENTE: D.^a Teresa Nieto Miguel

SUPLENTE: D.^a Patricia Gallego Muñoz

FECHA: 2024

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. RESUMEN Y ABSTRACT	7
2. INTRODUCCIÓN	9
2.1. Estructura del Trabajo.....	9
2.2. Contexto y Justificación del Estudio.....	11
2.3. Objetivos del Trabajo.....	14
2.4. Revisión de la Literatura.....	15
2.5. Importancia de la Investigación.....	19
3. MATERIALES Y MÉTODOS	21
3.1. Materiales.....	21
3.2. Métodos.....	24
3.2.1. Líneas Celulares y Cultivo.....	24
3.2.2. Síntesis y purificación de gRNA.....	24
3.2.3. Ensayo de T7 para Evaluar la Eficiencia de Edición.....	25
3.2.4. Electroporación de la Maquinaria CRISPR/Cas9.....	26
3.2.5. PCR y Análisis Genético.....	27
3.2.6. Dilución Límite y Clonación.....	28
3.2.7. Secuenciación de Clones Mutados.....	29
4. RESULTADOS	30
4.1. Eficiencia de Edición Genética.....	30
4.2. Selección y Análisis de Clones.....	34
4.3. Secuenciación y Verificación de Mutaciones.....	36
5. DISCUSIÓN	39
5.1. Heterocigosidad y Comparación con Estudios Previos.....	39
5.2. Limitaciones del Estudio.....	41
5.3. Implicaciones Clínicas y Futuras Investigaciones.....	44
6. CONCLUSIÓN	46
7. BIBLIOGRAFÍA	47
8. ANEXOS	52

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS:

Figuras:

1. Esquema del proceso de edición genética utilizando CRISPR/Cas9.....	15
2. Esquema del Complejo II mitocondrial.....	16
3. Ensayo de T7 Endonuclease I y sus resultados de corte en el ADN.....	26
4. Secuencia Genómica visualizado con “ <i>SnapGene Viewer</i> ” del Exón 12 del Gen SDHA Humano Anotado con Sitio de Corte de Cas9, Oligo donante y Mutación de interés.....	27
5. PCR para verificar el ensayo T7 en las células transfectadas. Carril 1: gRNA0 con enzima T7, Carril 2: gRNA0 sin enzima T7 (no corta), Carril 3: gRNA1 con enzima T7, Carril 4: gRNA1 sin enzima T7 (no corta), Carril 5: WT con enzima T7, Carril 6: WT sin enzima T7.....	31
6. Electroforesis de PCR de Región Completa (Izquierda) con 1, 1* y WT (de izquierda a derecha), PCR Mutante (Derecha) con 1, 1* y WT (de izquierda a derecha).....	32
7. Esquema de clones positivos en PCR mutante tras la dilución límite.....	34
8. Representación gráfica con SnapGene Viewer de la secuenciación del Clon 30, donde se observa un pico de C solapado a un pico mayor de T en la posición que correspondería a la mutación (Sombreado amarillo).....	37
9. Alineamiento empleando VectorBuilder del Clon 30 en la zona de interés (Abajo, mutación 1660 C>T), con respecto a la secuencia de referencia de SDHA sin mutar (arriba).....	37

Tablas:

1. Principales enfermedades causadas por mutación en SDHA.....	12
2. Secuencias de primers empleados, del Oligo-donante y de los oligonucleótidos molde.....	23
3. Resumen de las principales limitaciones del estudio y sus posibles implicaciones.....	43

AGRADECIMIENTOS:

A toda mi familia, gracias por estar ahí en los momentos más complicados y por darme una vida llena de enseñanza y compromiso. A mi padre, que me ha enseñado todo lo que soy y seré, y me ha educado desde el cariño y la humildad para poder llegar a donde me proponga. A mi madre que, a mayores de darme la vida, me ha enseñado que es una luchadora y que no hay que rendirse con nada que se nos ponga por el camino. A mi hermano, pese a tu juventud, confío en que encuentres tu lugar y sigas siendo tú mismo en todo el camino.

A todos aquellos que han formado parte de esta etapa universitaria. Me han dado un sitio en sus vidas y me han enseñado que la universidad es mucho más que una formación, es una parte de tu vida que, si te rodeas de gente que merece la pena, se convierte en una parte de tu corazón para siempre.

A mis profesores, y especialmente a mis tutores; Miguel Ángel y Mariaje. Gracias por haber estado ahí en todo lo que he necesitado en esta fase de mi carrera. Habéis sabido guiarme y darme un sitio en vuestro laboratorio para que me sintiese parte del mismo. Me habéis demostrado ser excelentes profesionales y excelentes personas, así que os estaré siempre agradecido.

A todo el IBGM, en especial al laboratorio B3, con todos sus integrantes, muchísimas gracias por acogerme.

Por último, gracias a todos mis amigos que son tan importantes para mí en el día a día, por vuestros consejos y por darme seguridad para aventurarme en esta carrera, espero que estéis orgullosos como yo lo estoy de vosotros.

Gracias a todos.

ABREVIATURAS:

- **CRISPR/Cas9:** Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats / CRISPR-associated protein 9. Herramienta de edición genética que permite realizar cortes precisos en el ADN.
- **DNA:** Deoxyribonucleic Acid. Ácido desoxirribonucleico, molécula que contiene la información genética.
- **RNA:** Ribonucleic Acid. Ácido ribonucleico, molécula que participa en la transcripción y traducción del ADN.
- **gRNA:** Guide RNA. RNA guía utilizado en la tecnología CRISPR para dirigir la enzima Cas9 al sitio específico del ADN.
- **PCR:** Polymerase Chain Reaction. Reacción en cadena de la polimerasa, técnica utilizada para amplificar fragmentos de ADN.
- **SDHA:** Succinate Dehydrogenase Complex, Subunit A. Gen que codifica una subunidad del complejo II de la cadena respiratoria mitocondrial.
- **WT:** Wild Type. Tipo salvaje, refiere al genotipo o fenotipo natural no mutado.
- **KO:** Knockout. Organismo o célula en la que se ha inactivado un gen específico para estudiar su función.
- **IVT:** In Vitro Transcription. Transcripción in vitro, proceso de síntesis de RNA a partir de molde de ADN en un entorno controlado de laboratorio.
- **DMEM:** Dulbecco's Modified Eagle Medium. Medio de cultivo utilizado para el crecimiento de células eucariotas en cultivo.
- **PBS:** Phosphate Buffered Saline. Solución salina tamponada con fosfatos, utilizada para lavar y mantener las células a pH fisiológico.
- **Neon™ Transfection System:** Sistema de electroporación utilizado para introducir material genético en las células.
- **U2OS:** Línea celular derivada de osteosarcoma humano, utilizada en investigaciones científicas.
- **143-B:** Línea celular de osteosarcoma humano utilizada en este estudio para la edición genética.
- **TE:** Tris-EDTA. Solución utilizada para proteger el ADN de la degradación.

1. RESUMEN Y ABSTRACT:

Resumen:

En este trabajo de fin de grado, se desarrolló un modelo celular para el estudio de enfermedades mitocondriales utilizando la herramienta de edición genética CRISPR/Cas9. El objetivo principal fue introducir la mutación 1660C>T asociada con el síndrome de Leigh (un trastorno neurodegenerativo severo), en el gen SDHA que forma parte del Complejo II mitocondrial. Para ello, se seleccionaron guías de RNA (gRNA) específicas, sintetizadas y purificadas mediante técnicas estándar. Las condiciones de electroporación fueron optimizadas en células U2OS utilizando el sistema de electroporación Neon, para luego aplicarlas en la línea celular 143-B. Se utilizó un oligo donante específico para introducir la mutación deseada. Tras la electroporación, se sembraron las células mediante dilución límite y se preparó DNA genómico para su análisis por PCR con objeto de identificar las células donde ha ocurrido edición génica. Falta por analizar mediante secuenciación "Sanger" si la edición ha ocurrido sin errores y si está en heterocigosis u homocigosis. Este modelo celular proporcionará una plataforma valiosa para estudiar los cambios metabólicos y funcionales causados por dicha mutación y abre la posibilidad de ensayar estrategias que recuperen las funciones celulares alteradas presentes en este síndrome. La creación de modelos celulares específicos para enfermedades genéticas permite una mejor comprensión de los procesos patológicos y ofrece oportunidades para desarrollar y ensayar terapias innovadoras.

Abstract:

In this final degree project, a cellular model was developed to study mitochondrial diseases using the CRISPR/Cas9 gene-editing tool. The main objective was to introduce the 1660C>T mutation, associated with Leigh syndrome (a severe neurodegenerative disorder), into the SDHA gene, part of mitochondrial Complex II. Specific RNA guides (gRNA) were selected, synthesized, and purified using standard techniques. Electroporation conditions were optimized in U2OS cells using the Neon electroporation system, later applied to the 143-B cell line. A specific donor oligonucleotide was used to introduce the desired mutation. Following electroporation, cells were seeded using a limiting dilution method, and genomic DNA was prepared for PCR analysis to identify gene-edited cells. Sanger sequencing is pending to confirm whether the editing occurred without errors and to determine if the mutation is in heterozygous or homozygous form. This cellular model will provide a valuable platform to study the metabolic and functional changes caused by this mutation, and it opens the possibility of testing strategies to restore the altered cellular functions present in this syndrome. The creation of specific cellular models for genetic diseases enables a better understanding of pathological processes and offers opportunities to develop and test innovative therapies.

Palabras Clave:

CRISPR/Cas9 - edición genética - mutación 1660C>T - gen SDHA - síndrome de Leigh – gRNA1 - electroporación - PCR - secuenciación - clonación - células U2OS - células 143-B

Key Words:

CRISPR/Cas9 - genome editing - 1660C>T mutation - SDHA gene - Leigh syndrome - gRNA1 - electroporation - PCR - sequencing - cloning - U2OS cells - 143-B cells

2. INTRODUCCIÓN:

2.1. Estructura del Trabajo:

El presente trabajo está estructurado en varias secciones, cada una de las cuales aborda diferentes aspectos del desarrollo y estudio del modelo celular para el síndrome de Leigh. A continuación, se detallan los componentes principales de este proyecto:

La introducción proporciona una visión general de las enfermedades mitocondriales, enfocándose en el síndrome de Leigh y la importancia de las mitocondrias en la fisiología celular. Se presenta el contexto y la justificación del estudio, subrayando la necesidad de modelos celulares específicos para comprender mejor estas enfermedades y desarrollar estrategias terapéuticas efectivas. Este capítulo también revisa brevemente la tecnología CRISPR/Cas9 y su aplicación en la edición genética, destacando sus ventajas y limitaciones en el contexto de la biomedicina mitocondrial.

En la revisión de la literatura, se revisan los contenidos científicos relevantes sobre las enfermedades mitocondriales y el síndrome de Leigh. Se exploran estudios clave que han utilizado CRISPR/Cas9 para editar genes localizados en el genoma nuclear, y se discuten los avances en la comprensión de los mecanismos patológicos de estas enfermedades. También se revisan las aplicaciones terapéuticas potenciales de la edición genética y los desafíos técnicos y éticos asociados. Este análisis de la literatura proporciona una base sólida para la investigación presentada en este trabajo, siguiendo el contexto de los avances actuales y destacando la relevancia de los objetivos planteados.

En la sección de materiales y métodos, se detallan los procedimientos experimentales empleados en el estudio. Se describen las líneas celulares utilizadas, los medios de cultivo, y las técnicas específicas de edición genética y análisis molecular. Esto incluye la síntesis y purificación de guías de RNA (gRNA), las condiciones de electroporación optimizadas para la introducción de CRISPR/Cas9 en las células 143-B, y los métodos de PCR y secuenciación utilizados para confirmar la edición genética. Esta sección es crucial para garantizar la reproducibilidad de los experimentos y la validez de los resultados obtenidos.

Los resultados obtenidos del estudio se presentan de manera detallada, comenzando con la eficiencia de la edición genética en las células 143-B. Se muestran los datos de las PCR y los resultados de la secuenciación para establecer una hipótesis sobre la introducción de la mutación 1660C>T en el gen SDHA. Además, se discuten los resultados obtenidos de la caracterización de los clones celulares hipotéticamente mutados, incluyendo la posible identificación de clones con mutaciones, a pesar de la poca firmeza de los resultados. Esta sección proporciona una comprensión de los logros experimentales y su relevancia para el estudio del síndrome de Leigh.

La discusión interpreta los resultados presentados en la sección anterior, comparándolos con estudios previos y evaluando sus implicaciones en el contexto de la investigación sobre enfermedades mitocondriales. Se analizan las limitaciones del estudio y se proponen posibles mejoras y futuras líneas de investigación. Esta sección también explora las implicaciones clínicas de los hallazgos y su potencial impacto en el desarrollo de nuevas terapias. El análisis crítico de los resultados ayuda a situar el trabajo en el panorama más amplio de la investigación biomédica y proporciona una base para estudios futuros.

La conclusión resume los hallazgos más importantes del estudio y su relevancia para la comprensión del síndrome de Leigh. Se destacan las principales contribuciones del trabajo y se ofrecen perspectivas sobre futuras investigaciones en el ámbito del trabajo de investigación realizado. Esta sección cierra el trabajo con una reflexión sobre los avances logrados y los desafíos pendientes, enfatizando la importancia de la investigación continua en este campo.

La bibliografía incluye todas las referencias citadas a lo largo del trabajo, siguiendo el formato APA. Esta sección es esencial para proporcionar el contexto adecuado a los lectores y permitirles profundizar en los estudios mencionados.

Los anexos contienen información adicional que apoya o amplía los resultados y métodos descritos en el trabajo principal, así como resúmenes detallados y esquemáticos. Esto puede incluir materiales relevantes que no se incluyeron en el cuerpo principal del texto pero que son importantes para una comprensión completa del estudio. Los anexos proporcionan una fuente de información complementaria que enriquece el contenido principal y facilita la reproducción de los experimentos.

2.2. Contexto y Justificación del Estudio:

Las enfermedades mitocondriales constituyen un grupo heterogéneo de trastornos genéticos que afectan al funcionamiento de las mitocondrias, organelos esenciales para la producción de energía celular mediante la fosforilación oxidativa. Estas patologías pueden manifestarse en diversos órganos y tejidos, pero suelen tener un impacto considerable en aquellos que requieren altas cantidades de energía, como el sistema nervioso central, el corazón y los músculos esqueléticos [1]. Las mitocondrias no solo generan ATP, sino que también desempeñan roles fundamentales en la regulación del metabolismo celular, la señalización celular y la apoptosis. La diversidad de manifestaciones clínicas, que pueden ir desde la debilidad muscular hasta graves disfunciones multisistémicas, complica el diagnóstico y tratamiento de estas enfermedades, subrayando la necesidad de un enfoque multidisciplinario y de modelos de estudio adecuados.

El síndrome de Leigh, también conocido como encefalopatía necrotizante subaguda infantil, es una enfermedad neurodegenerativa progresiva que típicamente se presenta en los primeros años de vida y que puede tener múltiples causas. Está caracterizado por lesiones simétricas en el sistema nervioso central, particularmente en los ganglios basales, tronco encefálico y la médula espinal. Clínicamente, los pacientes pueden presentar retraso en el desarrollo psicomotor, debilidad muscular, problemas respiratorios y crisis convulsivas, entre otros síntomas [2]. Este síndrome es una de las manifestaciones más graves de disfunción mitocondrial, y su diagnóstico se basa en una combinación de características clínicas, hallazgos de neuroimagen y pruebas genéticas que identifican mutaciones patogénicas. La identificación temprana y precisa de estas mutaciones es crucial para el manejo y tratamiento de los pacientes afectados.

Las mutaciones en el gen SDHA, que codifica la subunidad A de la succinato deshidrogenasa, una enzima clave del complejo II de la cadena respiratoria mitocondrial, son responsables de aproximadamente el 8% de los casos de síndrome de Leigh. Nosotros nos centramos en el estudio de una de las mutaciones descritas como causa de este síndrome, en concreto 1660C>T, que resulta en un cambio de aminoácido que compromete la función normal de la enzima, alterando la producción de energía celular y conduciendo a la acumulación de metabolitos tóxicos que dañan el tejido neurológico [3]. La succinato deshidrogenasa no solo es esencial para la cadena de transporte de electrones, sino que también juega un papel crucial en el ciclo del ácido cítrico, conectando la respiración celular con el metabolismo energético. La disfunción en esta enzima puede desencadenar una cascada de eventos metabólicos adversos, exacerbando el daño celular y contribuyendo a la progresión de la enfermedad.

El desarrollo de modelos celulares de enfermedades mitocondriales es uno de los métodos posibles para el estudio de los mecanismos patológicos subyacentes y para potencialmente avanzar en el diseño de nuevas estrategias terapéuticas. Los modelos animales, a pesar de las diferencias fisiológicas y genéticas con los humanos, serían de gran importancia para trasladar los conocimientos adquiridos en los modelos celulares. Los modelos celulares, sin embargo, ofrecen una plataforma más accesible, manipulable y económica para estudiar la biología de las células humanas y ensayar nuevas terapias potenciales [4].

En este contexto, el presente trabajo busca utilizar la tecnología CRISPR/Cas9 para introducir la mutación 1660C>T en el gen SDHA en células de la línea celular humana de osteosarcoma 143-B, con el fin de generar un modelo celular que reproduzca alguna de las características del síndrome de Leigh. La creación de modelos celulares específicos no solo facilita el estudio de los mecanismos de la enfermedad, sino que también permite la evaluación de posibles terapias en un entorno controlado. Esto

puede acelerar el desarrollo de tratamientos efectivos y personalizados para los pacientes afectados por el síndrome de Leigh y otras enfermedades mitocondriales.

La tecnología CRISPR/Cas9, con su capacidad para realizar ediciones precisas y específicas en el genoma, proporciona una herramienta sin precedentes para la creación de modelos celulares de enfermedades genéticas. Esta tecnología no solo permite la introducción de mutaciones específicas, sino que también puede ser utilizada para corregir mutaciones patogénicas, abriendo la puerta a posibles terapias génicas para una amplia gama de enfermedades genéticas. La combinación de estas tecnologías promete avanzar significativamente en nuestra comprensión y tratamiento de enfermedades complejas como el síndrome de Leigh.

- **Mutaciones en SDHA y Enfermedades Asociadas:**

Las mutaciones en el gen SDHA, que codifica la subunidad A de la SDH, pueden llevar a varias enfermedades mitocondriales (Tabla 1).

Terapias Potenciales:

- I. **Terapia génica:** La corrección de mutaciones en el gen SDHA mediante tecnologías como CRISPR/Cas9 ofrece una posibilidad prometedora para tratar las deficiencias de SDH. Esta técnica permite la edición del ADN, corrigiendo potencialmente, las mutaciones causales en células afectadas [5].
- II. **Suplementos y terapias metabólicas:** La administración de suplementos como la coenzima Q10, que participa en la cadena de transporte de electrones, puede ayudar a mejorar la función mitocondrial en pacientes con deficiencias de SDH [6].
- III. **Desarrollo de inhibidores específicos:** En el caso de tumores relacionados con SDH, el desarrollo de inhibidores que puedan reducir la acumulación de succinato o bloquear su efecto oncogénico es un área activa de investigación [3].

Tabla 1. Principales enfermedades causadas por mutación en SDHA:

Enfermedad	Descripción	Mutación	Referencias
Síndrome de Leigh	Enfermedad neurodegenerativa caracterizada por lesiones simétricas en el sistema nervioso central, con síntomas que incluyen debilidad muscular, problemas respiratorios y crisis convulsivas.	c.1660C>T (p.Arg554Trp), c.1664G>A (p.Gly555Glu)	Rahman et al., 1996 [2]; Parfait et al., 2000 [3]
Deficiencia de Complejo II (Succinato Deshidrogenasa)	Trastorno metabólico que resulta en una producción deficiente de energía. Puede presentarse con síntomas como fatiga, debilidad muscular y problemas cardíacos.	c.1664G>A (p.Gly555Glu), c.1099G>A (p.Glu367Lys)	DiMauro & Schon, 2003 [1]

Miopatía Mitocondrial	Condición que afecta principalmente a los músculos, causando debilidad muscular y fatiga.	c.308A>G (p.His103Arg), c.1099G>A	DiMauro & Schon, 2003 [1]
Encefalomiopatía Neurogastrointestinal con Depleción de ADNmt (MNGIE)	Enfermedad rara que afecta el sistema nervioso central, los músculos y el sistema digestivo.	c.1660C>T (p.Arg554Trp), c.308A>G	Freyer et al., 2012 [4]

2.3. Objetivos del Trabajo:

Las enfermedades mitocondriales representan un desafío significativo en la biomedicina debido a su diversidad y complejidad clínica. El síndrome de Leigh es uno de los trastornos más graves dentro de este grupo.

Este proyecto se centra en aplicar CRISPR/Cas9 para introducir la mutación 1660C>T en la línea celular 143-B, creando un modelo que replicará las características genéticas del síndrome de Leigh. Los objetivos específicos son:

1. **Diseñar guías de RNA (gRNA) específicas para el gen SDHA:** Optimizar una herramienta CRISPR/Cas9 con el diseño de gRNAs de alta eficiencia y especificidad en la edición genética para introducir la mutación 1660C>T.
2. **Evaluar la eficiencia de las guías gRNA en la edición genética:** Realizar pruebas in vitro para determinar la guía más eficiente, utilizando un tipo celular modelo para asegurar la capacidad de corte en el sitio diana.
3. **Detectar y seleccionar clones celulares mutados:** Emplear técnicas de PCR específicas para identificar y aislar clones que hayan incorporado exitosamente la mutación.
4. **Confirmar la presencia de la mutación mediante secuenciación de ADN:** Verificar la introducción precisa de la mutación 1660C>T y evaluar la ausencia de mutaciones adicionales no deseadas a través de la secuenciación de ADN, asegurando la exactitud del proceso de edición genética y la idoneidad de los clones seleccionados para estudios posteriores.
5. **Evaluar el impacto funcional de la mutación en modelos celulares:** Realizar estudios funcionales y bioquímicos en los clones celulares editados para investigar cómo la mutación 1660C>T afecta la función mitocondrial y contribuye a la patogénesis del síndrome de Leigh, proporcionando información clave para el desarrollo de posibles intervenciones terapéuticas.

2.4. Revisión de la Literatura:

- Funcionamiento del Sistema CRISPR/Cas9:

La edición genética mediante CRISPR/Cas9 ha revolucionado el campo de la biología molecular al permitir la manipulación precisa de secuencias específicas de ADN en diversos organismos. Este sistema utiliza una guía de ARN (gRNA) que dirige la endonucleasa Cas9 a un sitio particular en el genoma, donde genera cortes de doble hebra (Figura 1) [5]. Estos cortes pueden ser reparados por las vías de reparación del ADN celular, resultando en la desactivación de un gen (knock-out) o en la incorporación de una secuencia deseada mediante una plantilla de reparación (knock-in) [5]. La versatilidad de CRISPR/Cas9 ha sido aplicada en numerosos estudios genéticos y biomédicos, como la corrección de mutaciones patogénicas y la creación de modelos de enfermedades. Su precisión para inducir cambios específicos en el ADN ha abierto nuevas posibilidades para el tratamiento de enfermedades genéticas mediante terapias génicas [5].

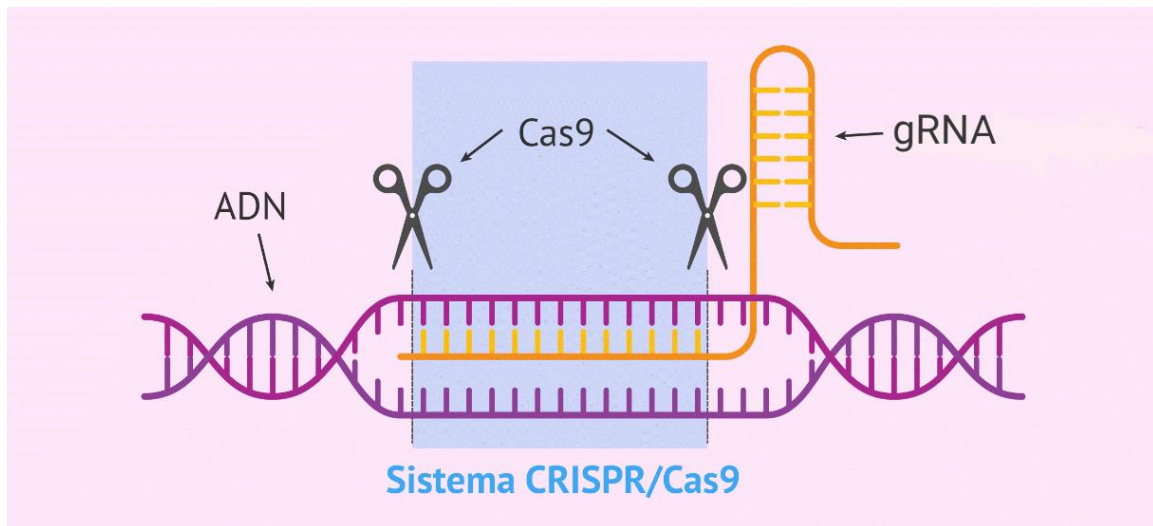


Figura 1: Esquema del proceso de edición genética utilizando CRISPR/Cas9 [7]

- Cadena Respiratoria Mitocondrial y Complejo II (CII):

La cadena respiratoria mitocondrial es un conjunto de complejos proteicos localizados en la membrana interna de la mitocondria que realizan la fosforilación oxidativa, produciendo ATP. Está compuesta por cinco complejos: Complejo I (NADH deshidrogenasa), Complejo II (succinato deshidrogenasa), Complejo III (citocromo bc1), Complejo IV (citocromo c oxidasa), y Complejo V (ATP sintasa). Cada complejo tiene un papel crucial en la transferencia de electrones y el bombeo de protones, generando un gradiente electroquímico utilizado para la síntesis de ATP [1].

El complejo II (CII), también conocido como succinato deshidrogenasa (SDH), es una enzima clave en la mitocondria que desempeña un papel dual crucial tanto en el ciclo de Krebs como en la cadena respiratoria. Durante el ciclo de Krebs, el complejo II oxida el succinato a fumarato, transfiriendo electrones a la ubiquinona en la cadena respiratoria, lo que es esencial para la producción de energía celular. La mutación 1660C>T en el gen SDHA, que codifica la subunidad A de esta enzima, compromete la

función de la SDH, resultando en una producción ineficiente de energía y la acumulación de metabolitos tóxicos como succinato, ya que el SDH no puede convertir adecuadamente el succinato en fumarato. La acumulación de succinato y otros intermediarios metabólicos genera un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), lo que contribuye al estrés oxidativo y daño celular [2].

La SDH, con su capacidad de integrarse en la membrana mitocondrial interna, está compuesta por cuatro subunidades principales (Figura 2): SDHA, donde se realiza la oxidación del succinato; SDHB, que contiene los centros hierro-azufre necesarios para la transferencia de electrones; y SDHC y SDHD, que anclan el complejo en la membrana y facilitan la transferencia de electrones a la ubiquinona, un paso crucial en la cadena de transporte de electrones [3].

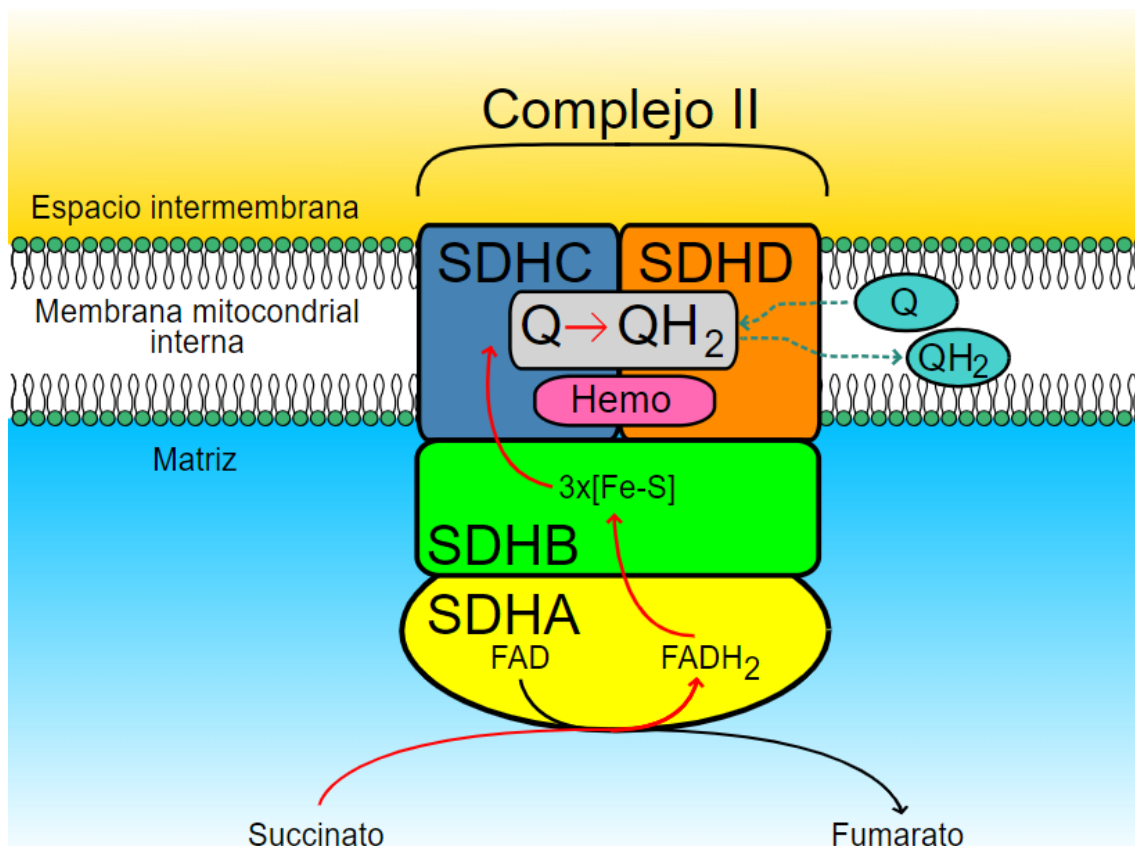


Figura 2. Esquema del Complejo II mitocondrial.[8]

- Aplicaciones y Retos del CRISPR/Cas9 en Enfermedades Mitocondriales:

El uso de CRISPR/Cas9 ha permitido avances significativos en la comprensión y tratamiento de diversas enfermedades genéticas. En el contexto de las enfermedades mitocondriales, esta herramienta que se ha utilizado para editar genes en el ADN nuclear, abre nuevas vías para el tratamiento de enfermedades que antes se consideraban intratables. Las mitocondrias, a menudo descritas como las "centrales energéticas" de la célula, son responsables de producir la mayor parte del ATP a través de la fosforilación oxidativa. Mutaciones en el ADN mitocondrial (ADNmt) o en

genes nucleares que codifican proteínas mitocondriales pueden llevar a una disfunción mitocondrial, resultando en una variedad de enfermedades, incluida la encefalopatía necrotizante subaguda, también conocida como síndrome de Leigh [1, 2].

El síndrome de Leigh es una enfermedad neurodegenerativa severa que generalmente se presenta en la infancia temprana y es causada por defectos en la cadena respiratoria mitocondrial. Esta enfermedad fue descrita por primera vez por Denis Leigh en 1951, quien detalló los hallazgos clínicos y neuropatológicos en un paciente infantil [2]. Desde entonces, se han identificado múltiples genes asociados con la enfermedad, incluyendo el gen SDHA. La mutación 1660C>T en el gen SDHA, que codifica una subunidad del complejo II de la cadena respiratoria mitocondrial, altera la función de la succinato deshidrogenasa, una enzima clave en el metabolismo energético celular [3].

- Modelos Celulares y Estudios Preliminares:

El desarrollo de modelos celulares específicos para estudiar el síndrome de Leigh puede ser de interés para entender los mecanismos patológicos y explorar posibles intervenciones terapéuticas. En este contexto, los modelos celulares humanos ofrecen una plataforma relevante y manipulable para investigar las enfermedades mitocondriales. Por ejemplo, Gammage et al. demostraron la eliminación casi completa de ADNmt mutado utilizando nucleasas mitocondriales específicas, subrayando la viabilidad de enfoques de edición genética en el tratamiento de estas enfermedades [6]. Estos avances sugieren que la corrección genética en células humanas puede ser una estrategia viable para tratar enfermedades mitocondriales, aunque aún quedan desafíos técnicos y éticos por superar.

La tecnología de secuenciación de nueva generación (NGS) ha sido instrumental en la identificación de mutaciones responsables de enfermedades mitocondriales. Calvo et al. utilizaron NGS para el diagnóstico molecular de enfermedades mitocondriales infantiles, lo que permitió una identificación rápida y precisa de mutaciones patogénicas en múltiples genes mitocondriales y nucleares [4]. Este enfoque ha mejorado significativamente la capacidad de diagnóstico y ha facilitado estudios genéticos más detallados, esenciales para el desarrollo de terapias dirigidas.

Ortigoza-Escobar et al. revisaron casos de síndrome de Leigh relacionado con mutaciones en el gen NDUFS4, proporcionando una visión integral de la variabilidad clínica y genética de la enfermedad [5]. Este estudio subraya la importancia de los modelos celulares para el estudio de las mutaciones específicas y su impacto en la función mitocondrial.

Un aspecto clave en la investigación de enfermedades mitocondriales es la comprensión de los mecanismos moleculares que subyacen a la disfunción mitocondrial. Suomalainen e Isohanni revisaron los síndromes de depleción del ADNmt, destacando que, a pesar de la diversidad genética, muchos de estos trastornos comparten mecanismos patológicos comunes, como la reducción de la biogénesis mitocondrial y el aumento del estrés oxidativo [1]. Este conocimiento es crucial para desarrollar intervenciones terapéuticas que puedan restaurar la función mitocondrial y aliviar los síntomas clínicos.

Por todo ello, la revisión de la literatura evidencia la importancia y el potencial de la tecnología CRISPR/Cas9 para la investigación y tratamiento de enfermedades mitocondriales. Los estudios mencionados destacan tanto los avances realizados como los desafíos que aún persisten en el campo de la edición genética y la

biomedicina mitocondrial. La capacidad de editar genes de manera precisa y eficiente ofrece nuevas esperanzas para el tratamiento de enfermedades genéticas complejas como el síndrome de Leigh, y continúa siendo un área de investigación prometedora.

2.5. Importancia de la Investigación:

El estudio de las enfermedades mitocondriales, como el síndrome de Leigh, es crucial debido a la severidad de estos trastornos y la falta de tratamientos efectivos. Las mitocondrias, responsables de la producción de ATP, la regulación de la apoptosis y la señalización celular, son esenciales para la función de los órganos con altas demandas energéticas, como el cerebro, el corazón y los músculos esqueléticos. Las disfunciones mitocondriales pueden tener consecuencias devastadoras para la salud humana, destacando la necesidad urgente de desarrollar nuevos enfoques terapéuticos [1].

I. Desarrollo de Modelos Celulares:

El desarrollo de modelos celulares que reproduzcan con precisión las características genéticas y fenotípicas de las enfermedades mitocondriales es esencial para avanzar en nuestra comprensión de estos trastornos. King y Attardi demostraron la posibilidad de repoblar células humanas que carecen de ADNmt con mitocondrias exógenas, un enfoque que ha inspirado numerosas investigaciones sobre la función mitocondrial y la corrección de disfunciones [21]. Estos modelos permiten estudios detallados de la patogénesis de las enfermedades y la evaluación de terapias en un entorno controlado. Además, la capacidad de editar el genoma de manera precisa utilizando CRISPR/Cas9 ha abierto nuevas oportunidades para investigar y potencialmente tratar enfermedades mitocondriales [5].

II. Implicaciones en la Biología Celular y Medicina:

Además de su relevancia terapéutica, la investigación sobre la función mitocondrial y sus disfunciones tiene implicaciones más amplias en la biología celular y la medicina. Hajnóczky y colaboradores han investigado en profundidad cómo la señalización del calcio en las mitocondrias desempeña un papel fundamental en la regulación de la muerte celular. Alteraciones en este proceso pueden provocar una disfunción mitocondrial que contribuya al desarrollo de diversas patologías, como enfermedades neurodegenerativas, cardíacas y metabólicas. Los niveles de calcio mitocondrial no solo son clave para la producción de ATP, sino que también están involucrados en la inducción de apoptosis, un proceso crítico en el mantenimiento del equilibrio celular y la prevención de daños tisulares [22]. Comprender estos mecanismos es esencial para desarrollar terapias que puedan mitigar los efectos de la disfunción mitocondrial.

III. Relevancia Terapéutica:

La mutación 1660C>T en el gen SDHA, vinculada al síndrome de Leigh, se usa en modelos celulares para estudiar las consecuencias de esta alteración genética [5]. Aunque estos modelos son herramientas valiosas, es importante aclarar que no replican completamente las condiciones del organismo humano. Las complejidades sistémicas del cuerpo, como las interacciones entre diferentes órganos y tejidos, no pueden ser completamente capturadas en un modelo celular. Sin embargo, estos modelos proporcionan una aproximación útil para estudiar los mecanismos subyacentes de la enfermedad y explorar posibles tratamientos.

Un aspecto crítico de esta investigación es su potencial para desarrollar terapias génicas que corrijan las mutaciones causales en enfermedades mitocondriales. DiMauro y colaboradores destacan varios enfoques para el tratamiento de enfermedades mitocondriales, incluyendo la terapia génica, la terapia celular y la farmacoterapia. La edición genética mediante CRISPR/Cas9 puede complementar estos enfoques al proporcionar una herramienta para corregir directamente las mutaciones en el ADN nuclear, abriendo nuevas posibilidades para el tratamiento de estas enfermedades devastadoras [5].

IV. Impacto en Enfermedades Crónicas:

La investigación sobre las enfermedades mitocondriales también puede proporcionar información valiosa sobre otras enfermedades crónicas. Mansouri y colaboradores discutieron cómo la disfunción mitocondrial y la señalización alterada están implicadas en enfermedades hepáticas crónicas, sugiriendo que las terapias dirigidas a mejorar la función mitocondrial podrían tener aplicaciones más amplias [20]. Este vínculo subraya la importancia de una investigación continua y exhaustiva en este campo, ya que mejorar la función mitocondrial podría beneficiar a pacientes con una variedad de condiciones crónicas.

A su vez, la investigación en este campo tiene el potencial de mejorar significativamente la calidad de vida de los pacientes. La capacidad de corregir estas mutaciones mediante edición genética no solo representa un avance científico, sino también una esperanza tangible para aquellos afectados por estas condiciones debilitantes. La combinación de modelos celulares precisos y herramientas de edición genética avanzadas promete transformar el panorama de la investigación y tratamiento de enfermedades mitocondriales.

3. Materiales y Métodos:

3.1. Materiales:

I. Líneas Celulares y Cultivo:

- Células U2OS (línea celular de osteosarcoma humano)
- Células 143-B (línea celular de osteosarcoma humano para estudios mitocondriales)
- DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium): Suero Fetal Bovino (FBS) 10%, Penicilina-estreptomicina 1%, Piruvato 1%, Aminoácidos 1%
- Tripsina-EDTA
- Cámara de Neubauer
- Microscopio de campo claro
- Placas de cultivo de 96 pocillos

II. Síntesis y Purificación de gRNA:

- Kit de Síntesis de gRNA GeneArt™ Precision (Thermo Fisher Scientific)
- Oligonucleótidos Molde usados para sintetizar las Guías (Tabla 2)
- Reactivos de transcripción in vitro (ribonucleótidos, T7 RNA polimerasa, tampones de reacción)
- Kit de Purificación de RNA (perteneciente a GeneArt™ Precision gRNA Synthesis Kit)
- NanoDrop
- Gel de agarosa

III. Electroporación y Condiciones Experimentales:

- Sistema de electroporación Neon® (Thermo Fisher Scientific)
- Buffer R
- gRNA1
- Cas9 (5 mg/ml)
- Oligodonante (Tabla 2)

IV. Ensayo de T7. PCR y Análisis Genético:

- Arcitect™ T7 endonuclease I Kit
- Buffer de Lisis + Proteinasa K (200 µg/mL)

- Primers para PCR mutante y global (Tabla 2)
- Reactivos de PCR (Taq polimerasa, dNTPs, tampones)
- Termociclador
- Kit MEGAquick-spin Plus

V. **Dilución Límite y Clonación:**

- Placas de cultivo de 96 pocillos
- DMEM
- Cámara de Neubauer
- Microscopio de contraste de fase invertido
- PBS

VI. **Secuenciación de Clones Mutados:**

- Primers específicos para el gen SDHA
 - Kit MEGAquick-spin Plus
 - Reactivos de PCR
 - Software de análisis bioinformático (VectorBuilder, SnapGene Viewer)
-

Tabla 2. Secuencias de primers empleados, del Oligo-donante y de los oligonucleótidos molde.

Reactivo	Secuencia
Oligo-donante	5'-CGTGTTCCGTGTGGGAAGCGTGTTGCAAGAAGGTTG TGGGAAAATCAGCAAGCTCTATGGAGACCTAAAGCATT AAAGACGTTTCGATTGGGGTGAGCAGACAGTGGGCTCTG TGCACACTGTTGCGCCCTTCCTTCTGCAGGGTGGGCTG GTGTCTGTCCCGTCAGTGCTGACTTAGTTCCGTGCTTGC TGTCTGGATG-3' ("T" en negrita es la mutación introducida)
hSDHA1660 test SEN	5'-AAA GCA TTT AAA GAC GTT CGA TT-3'
hSDHA int11 SEN	5'-TGG AAC ATG GTG CCT CAC AG-3'
hSDHA ex13 ATS	5'-GTG CCT CTG CTC CGT AGA TG-3'
gRNA0sdhaE121660FW	5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG CAC CTG AAG ACG TTC GAC CG-3'
gRNA0sdhaE121660RE	5'-TTC TAG CTC TAA AAC CGG TCG AAC GTC TTC AGG TG-3'
gRNA1sdhaE121660FW	5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GTG GGC TCT GTG CAC ACT GT GTGGGCTCTGTGCACACTGT-3'
gRNA1sdhaE121660RE	5'-TTC TAG CTC TAA AAC ACA GTG TGC ACA GAG CCC AC-3'

3.2. Métodos:

3.2.1. Líneas Celulares y Cultivo

En este estudio, se emplearon dos líneas celulares: **U2OS** y **143-B**, ambas derivadas de osteosarcoma humano, pero con características únicas que las hacen útiles para diferentes etapas del experimento.

Las **células U2OS** se utilizan ampliamente en estudios de transfección debido a su alta eficiencia y son particularmente relevantes para optimizar parámetros en técnicas de edición genética como CRISPR/Cas9. Estas células proporcionan un modelo robusto para probar condiciones experimentales iniciales antes de aplicarlas en otras líneas celulares más específicas.

Por otro lado, las **células 143-B**, además de ser derivadas de osteosarcoma humano, son ampliamente usadas en estudios sobre fisiología mitocondrial.

Ambas líneas celulares fueron cultivadas en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS), 1% de penicilina-estreptomicina, 1% de piruvato, y 1% de aminoácidos. Las células se mantuvieron en una incubadora a 37°C con 5% de CO₂ y 95% de humedad, y se subcultivaron al alcanzar una confluencia del 80-90% utilizando tripsina-EDTA para su disociación.

Para asegurar la precisión en los experimentos, las células fueron contadas mediante una cámara de Neubauer antes de cada transfección o procedimiento experimental, garantizando que se trabajara siempre con concentraciones celulares óptimas.

Finalmente, las células 143-B y U2OS fueron congeladas para almacenamiento a largo plazo utilizando DMEM con 10% de DMSO para su preservación en nitrógeno líquido, asegurando así la viabilidad celular para experimentos posteriores.

3.2.2. Síntesis y Purificación de gRNA

La correcta síntesis y purificación del gRNA son pasos fundamentales para garantizar la precisión en la edición genética mediada por CRISPR/Cas9. Se diseñaron dos guías específicas, gRNA0 y gRNA1, cuya diana es el gen SDHA.

Una vez determinadas las secuencias óptimas, la síntesis del gRNA se realizó utilizando el kit GeneArt™ Precision gRNA Synthesis Kit. Este kit proporciona los reactivos necesarios para llevar a cabo la transcripción in vitro. Durante la misma, la T7 RNA polimerasa cataliza la síntesis de ARN a partir de las plantillas de ADN diseñadas. Se utilizaron oligonucleótidos molde específicos: gRNA0sdhaE121660FW, gRNA0sdhaE121660RE, gRNA1sdhaE121660FW, gRNA1sdhaE121660RE (Tabla 2), que contenían la secuencia de la guía de RNA con la región diana del gen SDHA. Estos oligonucleótidos molde fueron diseñados cuidadosamente para asegurar la especificidad en el sitio de corte del gen SDHA y minimizar los posibles efectos off-target.

Después de la síntesis, se llevó a cabo la purificación de los gRNA utilizando un kit de purificación para ARN. Este proceso es crucial para eliminar impurezas y obtener un

ARN puro, ya que cualquier contaminante podría comprometer la eficacia de la transfección y los resultados de edición genética. Posteriormente, se verificó la calidad del ARN mediante electroforesis en gel de agarosa, permitiendo la visualización del gRNA producido.

La cuantificación y grado de pureza del RNA, se determinó con un NanoDrop. La pureza y concentración adecuadas son determinantes para el éxito de la edición genética. Una vez validadas las guías, se procedió a la transfección en las células U2OS para pruebas preliminares, seguidas por su aplicación en las células 143-B, con el objetivo de introducir la mutación 1660C>T en el gen *SDHA*. Este proceso riguroso garantiza que los componentes CRISPR/Cas9 estén perfectamente preparados para llevar a cabo la edición precisa en el genoma objetivo.

3.2.3. Ensayo de T7 para Evaluar la Eficiencia de Edición

El ensayo de T7 Endonuclease I es una técnica utilizada para evaluar la eficiencia de la edición genética mediada por CRISPR/Cas9. Este ensayo detecta la presencia de cortes en el ADN introducidos por la actividad de la Cas9 en los sitios dirigidos por guías de ARN (gRNA). La T7 Endonuclease I reconoce y corta los desemparejamientos en las hebras de ADN, lo que ocurre cuando el ADN editado rehibrida con el ADN de tipo salvaje. Al analizar los productos de este corte mediante electroforesis en gel de agarosa, es posible determinar de forma aproximada la eficiencia de las guías en la edición genética, comparando la intensidad de los productos de la digestión con la banda WT sin digerir.

La figura 3 ilustra el proceso del ensayo T7. El ADN genómico se extrae de una población celular transfectada con gRNA y la proteína Cas9. Posteriormente, se realiza una PCR para amplificar la región de interés, que incluye tanto productos de tipo salvaje como productos editados. Estos productos se desnaturalizan y rehibridan, creando heterodúplexes en caso de desalineaciones. La T7 Endonuclease I corta estas desalineaciones, y los productos resultantes se separan en un gel de agarosa, mostrando bandas adicionales si la edición ha sido efectiva.

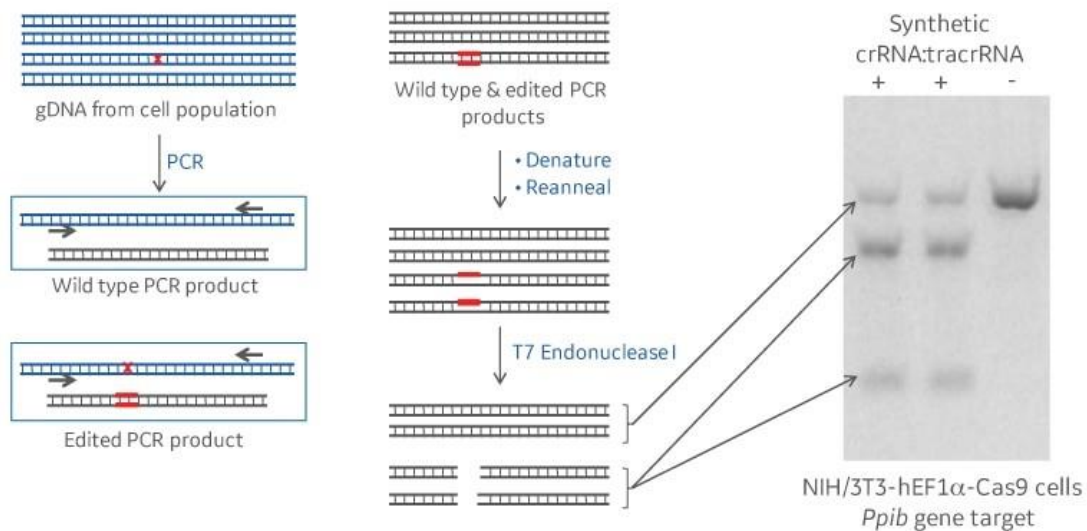


Figura 3. Ensayo de T7 Endonuclease I y sus resultados de corte en el ADN [30]

El análisis de los resultados permite determinar la eficiencia de cada gRNA mediante la observación de las bandas adicionales generadas en el gel, permitiendo así seleccionar la guía más eficiente para futuras transfecciones.

El ensayo T7, además de verificar la actividad de Cas9, es una herramienta poderosa para detectar ediciones genéticas en etapas tempranas, permitiendo optimizar las condiciones experimentales antes de pasar a modelos celulares más complejos o difíciles de transfectar.

3.2.4. Electroporación de la Maquinaria CRISPR/Cas9

La electroporación es fundamental para la edición genética, ya que permite la entrada de ARN guía (gRNA), Cas9 y el oligonucleótido donante en las células (Figura 4), mediante la aplicación de pulsos eléctricos que incrementan temporalmente la permeabilidad de la membrana celular. En este estudio, se empleó la electroporación para introducir la mutación 1660C>T en el gen *SDHA* de las células 143-B. El sistema de electroporación Neon® (Thermo Fisher Scientific) fue utilizado debido a su precisión para transfecciones en líneas celulares adherentes, con ajustes óptimos de 1300 V, 10 ms y 4 pulsos.

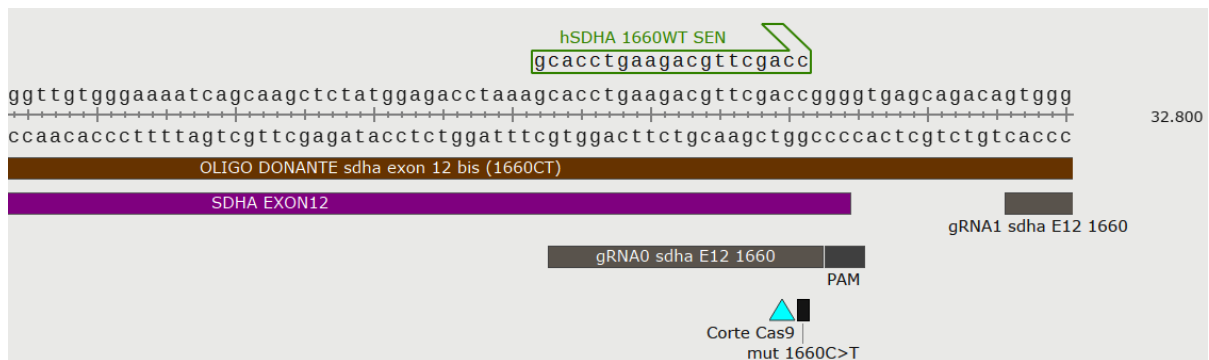


Figura 4. Secuencia Genómica visualizado con “SnapGene Viewer” del Exón 12 del Gen SDHA Humano Anotado con Sitio de Corte de Cas9, Oligo donante, Mutación de interés (1660 C>T) y guías (Grna1 y Grna0).

Antes de la electroporación, las células 143-B fueron cultivadas hasta alcanzar una confluencia del 80-90%. Se verificó su viabilidad mediante un ensayo de exclusión con azul de tripano, con un mínimo de 90% de células viables. Las células se recolectaron mediante tripsinización y centrifugación a 1200 rpm durante 5 minutos, y luego se resuspendieron en un tampón de electroporación optimizado para mantener su viabilidad.

Durante la electroporación, se prepararon mezclas que contenían gRNA1, Cas9, y el oligonucleótido donante, diseñados específicamente para editar la región deseada del gen *SDHA*. La electroporación se realizó en dos pocillos con 1 millón de células en cada uno, etiquetados como 1 y 1*, donde el pocillo 1* presentó una posible descarga eléctrica anómala, lo que motivó el descarte para experimentar con este pocillo de células.

Después del proceso, las células se sembraron en placas de 6 pocillos pre-calentadas con medio de cultivo fresco para reducir el estrés celular. A las 24 horas se realizó un cambio de medio y se monitoreó el crecimiento de las células durante 48 horas.

A las 48 horas post-electroporación, se extrajo ADN genómico para su estudio mediante PCR. Se utilizó un kit de extracción de ADN específico, seguido de una cuantificación y evaluación de pureza del ADN con un espectrofotómetro. La PCR permitió amplificar la región que contiene la mutación 1660C>T, utilizando como primers específicos: hSDHA1660 test SEN y hSDHA ex13 ATS, y los productos se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa para verificar la presencia de la mutación.

3.2.5. PCR y Análisis Genético

La amplificación de la región del gen *SDHA* que contiene la mutación 1660C>T se llevó a cabo utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para esto, se emplearon dos sets de primers: uno específico para detectar la mutación (PCR mutante) y otro que se utiliza para amplificar una región más amplia del gen, sirviendo

como control positivo para la amplificación de ADN genómico intacto (PCR de Región Completa).

Primers utilizados:

- **PCR Mutante:**
 - Primer Forward: hSDHA1660 test SEN (Tabla 2)
 - Primer Reverse: hSDHA ex13 ATS (Tabla 2)
- **PCR de Región Completa:**
 - Primer Forward: hSDHA int11 SEN (Tabla 2)
 - Primer Reverse: hSDHA ex13 ATS (Tabla 2)

Antes de iniciar la PCR, se llevó a cabo la extracción de ADN genómico de las células electroporadas utilizando un kit específico de extracción de ADN. Se evaluó la cantidad y pureza del ADN mediante espectrofotometría NanoDrop para asegurar concentraciones adecuadas para la PCR.

La mezcla de PCR contenía polimerasa, dNTPs, tampón de reacción y los primers mencionados. Se realizaron 35 ciclos de desnaturalización, alineamiento y extensión, con temperaturas y tiempos específicos para optimizar la amplificación. El programa incluyó una desnaturalización inicial a 98°C durante 2 minutos, seguido de 40 ciclos de 96°C (10 s), 63°C (15 s) y 72°C (30 s), finalizando con una extensión final a 72°C durante 5 minutos.

Después de la PCR, los productos amplificados fueron visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%. Se esperaban fragmentos de 739 pb para la PCR de Región Completa y 347 pb para la PCR mutante, lo que indicaría la posible presencia de la mutación.

3.2.6. Dilución Límite y Clonación

La dilución límite es una técnica fundamental en este estudio para obtener clones celulares individuales editados. Tras la electroporación y la confirmación de la edición genética mediante PCR mutante, las células editadas (143-B 1 y 1*) se recolectaron mediante tripsinización y se ajustaron a una concentración inicial de 375,000 células/ml. Para aislar clones individuales, se realizaron diluciones seriadas que redujeron progresivamente la concentración de células, asegurando que cada pozo de la placa de 96 pocillos contuviera una única célula viable.

El proceso de dilución límite comenzó con la preparación de suspensiones celulares de distintas concentraciones: 6.25, 12.5, 25 y 50 células/ml. Las placas se sembraron con 100 µl de la dilución seleccionada y 100 µl adicionales de medio de cultivo completo (DMEM suplementado con suero fetal bovino y antibióticos) de manera que haya: 0,6, 1,2, 2,5 y 5 células/pocillo. Posteriormente, las placas se incubaron en un ambiente controlado a 37°C y 5% de CO₂, con un monitoreo diario para identificar la formación de colonias individuales.

Cada colonia visible bajo el microscopio fue seleccionada para su expansión en placas de mayor tamaño. A continuación, se extrajo ADN genómico de cada clon expandido, y se realizaron PCRs para confirmar la posible presencia de la mutación 1660C>T. Los primers utilizados fueron los específicos para la región mutante del gen *SDHA* (hSDHA1660 test SEN y hSDHAex13 ATS). Los clones que mostraron una banda de 347 pb en la PCR mutante se consideraron positivos para el experimento.

Para preservar los clones generados, se tomó una fracción de las células de cada clon y se criopreservaron en medio de cultivo suplementado con 10% DMSO, garantizando su viabilidad a largo plazo.

3.2.7. Secuenciación de Clones Mutados

Para asegurar la correcta introducción de la mutación 1660C>T en el gen *SDHA*, se realizó la secuenciación en clones seleccionados. El ADN genómico se extrajo de los clones previamente identificados como positivos mediante PCR mutante y se cuantificó usando un espectrofotómetro para asegurar su pureza y calidad.

A continuación, se llevó a cabo una PCR específica utilizando los primers intron11SEN y exon13ATS, que amplifican la región del gen donde se encuentra la mutación. Tras la amplificación, los productos de PCR fueron verificados mediante electroforesis en gel de agarosa, confirmando la presencia de la banda esperada correspondiente a la región amplificada. Seguido de esto, los productos de PCR fueron purificados utilizando el kit MEGAquick-spin Plus para eliminar impurezas y obtener ADN listo para secuenciación.

Las muestras purificadas fueron enviadas a un servicio de secuenciación externo, en la empresa Macrogen, para obtener las secuencias de ADN. El análisis bioinformático se llevó a cabo con herramientas como VectorBuilder y SnapGene Viewer. Estas herramientas permitieron el alineamiento de las secuencias obtenidas con la secuencia de referencia del genoma humano, facilitando la identificación de cualquier cambio en la región del gen *SDHA*.

Este proceso de secuenciación es fundamental para confirmar si la mutación deseada fue introducida correctamente y para descartar cualquier mutación no deseada o errores en el proceso de edición genética. Además, permite la clasificación futura de los clones en heterocigotos o homocigotos para la mutación 1660C>T.

4. Resultados:

4.1. Eficiencia de Edición Genética:

La eficiencia de edición genética es un parámetro crucial en los experimentos de edición de genes, ya que determina la proporción de células en las cuales la modificación genética deseada ha sido correctamente introducida. En este estudio, se evaluó la eficiencia de la edición genética en las células 143-B mediante la técnica CRISPR/Cas9 para introducir la mutación 1660C>T en el gen SDHA, utilizando tanto la gRNA0 como la gRNA1. Los resultados se analizaron mediante PCR para confirmar la presencia y precisión de la mutación.

El protocolo de trabajo en la evaluación de la eficiencia de la edición genética, se divide en tres fases:

1. Extracción de ADN genómico.
2. Verificación mediante PCR y análisis genético.
3. Optimización de la Edición Genética.

Selección de gRNA:

Para evaluar la eficiencia de corte de las guías gRNA0 y gRNA1, se realizaron pruebas de transfección en células U2OS. Este tipo celular es fácil de transfectar y sirve como modelo adecuado para probar la funcionalidad de las guías antes de su aplicación en células más difíciles de transfectar, como las células 143-B. Las células U2OS se transfectaron con las guías gRNA0 y gRNA1 sin el oligo donante. Se utilizó el ensayo T7 Endonuclease I para determinar si la Cas9 generaba cortes en las ubicaciones específicas dirigidas por cada guía. Este ensayo permite detectar la eficiencia del corte mediante la identificación de mismatches en el ADN.

Los resultados de este ensayo se muestran en la imagen de electroforesis en gel de agarosa (Figura 5) de la PCR realizada a partir del ADN genómico extraído de las células U2OS transfectadas. Las concentraciones del ADN genómico fueron de 43,3 ng/μL para células con gRNA0, 60,1 ng/μL para células con gRNA1, y 74,5 ng/μL para células WT. Los pozos con ADN de células transfectadas con enzima T7 (carriles 1 y 3) muestran bandas adicionales, confirmando que tanto gRNA0 como gRNA1 pueden inducir cortes en el ADN. La presencia de bandas más intensas en los pozos correspondientes a gRNA1 parece indicar una mayor eficiencia de esta guía en comparación con gRNA0. Sin embargo, el control WT con enzima T7 también presenta bandas, lo que es de causa desconocida. Una hipótesis es que estas bandas pueden deberse a la presencia de sitios de corte inespecíficos o polimorfismos no identificados en el ADN WT que son reconocidos y cortados por la enzima T7. Esta observación requiere una investigación adicional para determinar las causas exactas y descartar posibles artefactos experimentales, y debido a ello no podemos confirmar que la gRNA1 sea verdaderamente más eficiente. No obstante, se seleccionó esta guía para continuar con los experimentos.

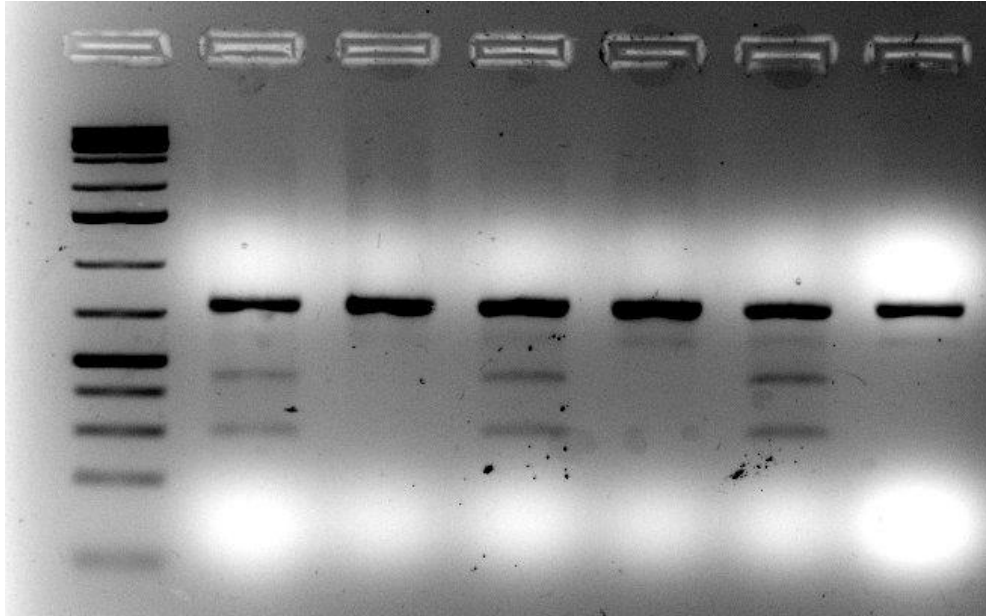


Figura 5. PCR para verificar el ensayo T7 en las células transfectadas. Carril 1: gRNA0 con enzima T7, Carril 2: gRNA0 sin enzima T7 (no corta), Carril 3: gRNA1 con enzima T7, Carril 4: gRNA1 sin enzima T7 (no corta), Carril 5: WT con enzima T7, Carril 6: WT sin enzima T7.

Extracción de ADN genómico:

Tras evaluar la eficiencia de edición en las células U2OS utilizando el ensayo T7, se procedió con la electroporación de las células 143-B empleando la guía gRNA1 seleccionada. Después de la electroporación, se extrajo ADN genómico de las células 143-B, específicamente de las muestras 1 y 1*, para su posterior análisis.

Una vez extraído el ADN genómico, se realizó una cuantificación y una posterior PCR. Se obtuvo una concentración de 200,6 ng/μl en el ADN de 143-B 1 y 190,7 ng/μl en el ADN de 143-B 1* utilizando el Nanodrop.

Verificación mediante PCR y análisis genético:

El análisis de los resultados de la PCR reveló varios aspectos importantes sobre la eficiencia de la edición genética (Figura 6):

1. **PCR de Región Completa:** En la PCR de región completa, los productos amplificados mostraron una banda de 739 pb en todas las muestras analizadas, incluyendo las muestras editadas con gRNA1 y las muestras WT. Esto indica que la región del gen SDHA fue amplificada correctamente en todas las muestras, sirviendo como control positivo para la presencia del ADN genómico intacto.
2. **PCR Mutante:** La PCR mutante, diseñada para detectar específicamente la mutación 1660C>T, mostró bandas de 347 pb únicamente en las muestras editadas con gRNA1. Las muestras WT no presentaron ninguna banda, confirmando la especificidad de los primers mutantes para la detección de la mutación introducida. Este es un resultado importante puesto que se

demuestra que con la gRNA usada, se consigue edición genética, aunque no se pueda calcular con este método la eficiencia.

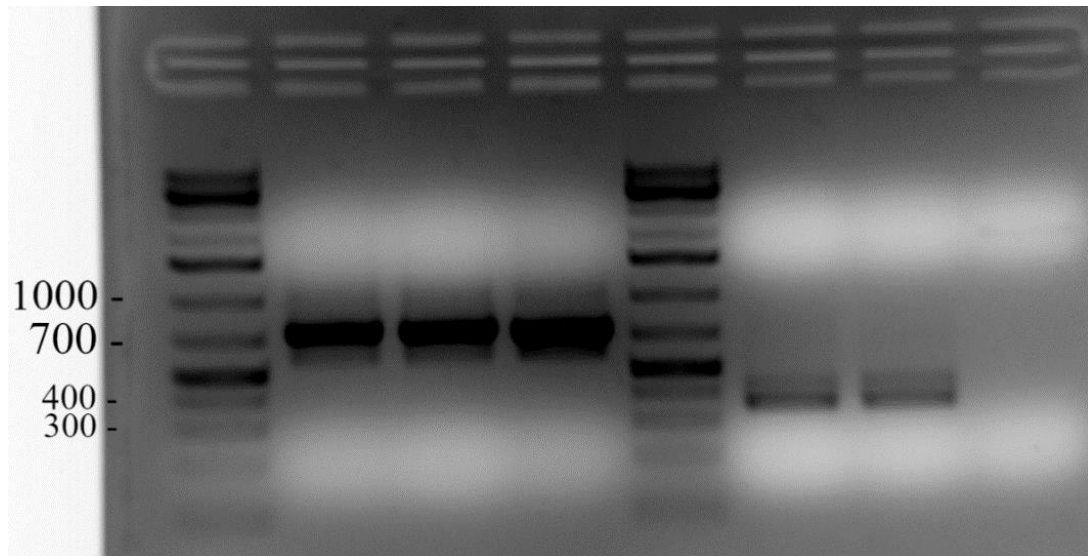


Figura 6. Electroforesis de PCR de Región Completa (Izquierda) con 1, 1* y WT (de izquierda a derecha), PCR Mutante (Derecha) con 1, 1* y WT (de izquierda a derecha)

A mayores, se diseñó el oligo donante con un sitio de corte específico para la enzima HHA1, de manera que, tras la introducción de la mutación 1660C>T en el gen SDHA, se generara un nuevo sitio de restricción reconocible por dicha enzima. Para verificar la edición genética, se llevó a cabo una digestión enzimática con HHA1 en los productos de PCR obtenidos de las muestras editadas. Posteriormente, los productos digeridos fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa. Sin embargo, los resultados no fueron concluyentes, ya que no se observaron diferencias claras entre las muestras digeridas y los controles, lo que impidió confirmar de manera definitiva la introducción de la mutación a través de este método.

Optimización de las Condiciones de Electroporación

Para optimizar las condiciones de electroporación buscando una mejora en la edición genética, se llevaron a cabo varios pasos adicionales durante el experimento:

Condiciones de electroporación: La optimización de las condiciones de electroporación, incluyendo el voltaje, duración del pulso y número de pulsos, fue fundamental para maximizar la viabilidad celular y mejorar la eficacia de la transfección. Aunque la cantidad de gRNA, Cas9 y oligo donante se había optimizado previamente en el laboratorio utilizando células U2OS, las condiciones específicas de voltaje, tiempo y pulsos se probaron directamente en células 143-B. Se evaluaron cuatro condiciones diferentes:

- 1400V, 15ms, 4 pulsos, que resultó en muy poca viabilidad celular.
- 1230V, 10ms, 4 pulsos.

- 1300V, 15ms, 2 pulsos.
- 1300V, 10ms, 4 pulsos, que fue la condición seleccionada. Estas pruebas se realizaron con otra mutación previamente en el laboratorio, y la condición seleccionada mostró una viabilidad celular adecuada y una alta eficiencia de transfección.

4.2. Selección y Análisis de Clones:

El proceso de selección y análisis de clones es esencial para identificar y validar las células que han sido editadas correctamente. Esta fase del experimento incluyó la clonación y el análisis genético para confirmar la precisión y eficiencia de la técnica CRISPR/Cas9, asegurando que solo los clones con la edición genética deseada fueran seleccionados para estudios posteriores.

Proceso de Selección de Clones

Después de confirmar que ha tenido lugar la edición genética mediante PCR en las células 143-B, se procedió con la dilución límite para aislar clones individuales. Este método asegura que cada clon proviene de una única célula editada, permitiendo una caracterización precisa de la mutación introducida.

De este proceso, se seleccionaron un total de 67 clones únicos para su expansión y análisis posterior. Los clones se cultivaron en condiciones específicas para asegurar su viabilidad y crecimiento óptimo, y cada uno fue sometido a una serie de pruebas adicionales para confirmar la presencia y exactitud de la mutación 1660C>T.

Análisis de Clones

Los clones seleccionados se sometieron a un riguroso análisis genético para confirmar la presencia de la mutación 1660C>T y asegurar que la edición genética fue precisa y específica. Esto se logró a partir de los métodos mencionados en el apartado “3.2.6 Dilución Límite y Clonación”:

1. Los clones que mostraron una banda de 347 pb fueron considerados positivos. De los 67 clones analizados, resultaron positivos los clones 2, 7, 10, 14, 18, 20, 21, 30, 34, 36, 40, 49, 54, 57, 59 y 71 (Figura 7).

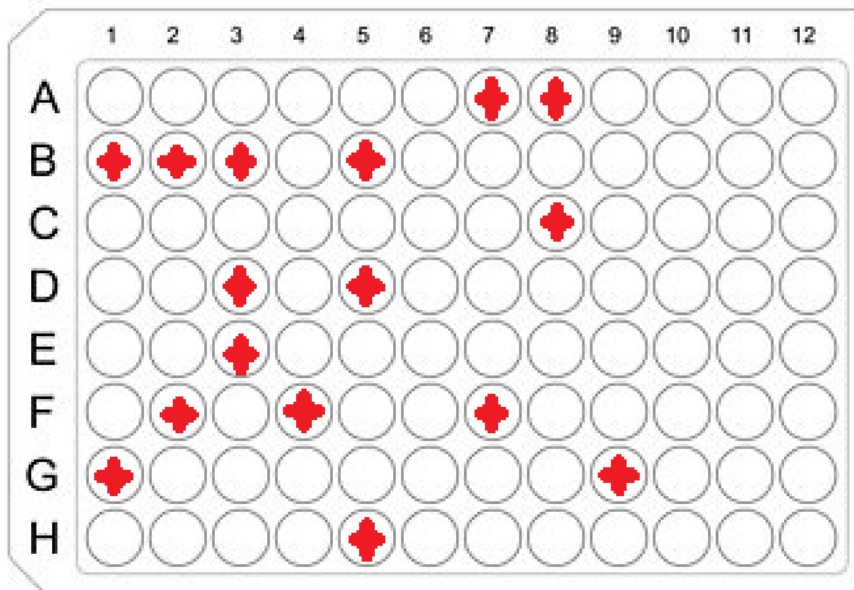


Figura 7. Esquema de clones positivos en PCR mutante tras la dilución límite.

2. PCR de Región Completa para confirmación adicional: Se realizó la PCR de Región Completa de todos los clones positivos utilizando los primers intron11SEN y exon13ATS (Tabla 2). Esta PCR sirvió para confirmar la integridad del gen SDHA y la obtención de bandas del tamaño esperado. La amplificación mostró una banda de 739 pb en todas las muestras analizadas. Posteriormente, se purificó el ADN para su posterior secuenciación y análisis de los resultados esperados.

Resultados del Análisis

Los resultados del análisis de clones revelaron los siguientes datos en consonancia con la posible introducción de la mutación 1660C>T en el gen SDHA:

1. Proporción de clones positivos: De los 67 clones analizados, 16 (aproximadamente el 24%) mostraron amplificación de la PCR con el primer mutante y que, por tanto, se concluye que pueden tener la mutación, aunque es necesario confirmarlo por secuenciación, lo que confirma parcialmente la eficacia de la gRNA1 en la edición genética de las células 143-B.
2. Validación de la edición genética: La PCR de Región Completa confirmó la integridad del gen SDHA en los clones positivos, mostrando bandas de 739 pb. Este análisis detallado aseguró que la edición genética fue correcta (su especificidad se determinará con la secuenciación) y que el proceso de selección de clones fue efectivo.

4.3. Secuenciación y Verificación de Mutaciones:

Preparación de Muestras:

Para confirmar la introducción precisa de la mutación 1660C>T en el gen SDHA, se realizó la secuenciación de los clones seleccionados. Se extrajo ADN genómico de los clones positivos identificados mediante PCR mutante. Las muestras de ADN se prepararon y se enviaron a un servicio de secuenciación externo (Macrogen).

Análisis de Secuenciación:

Los resultados de la secuenciación fueron inconclusos debido a la baja calidad de las secuencias obtenidas. La mayoría de las secuencias presentaron picos solapados y tamaños inconsistentes, lo que impidió una lectura clara de las mutaciones y sugiere que la secuenciación no fue exitosa en estos casos.

Los problemas de calidad en las secuencias pueden deberse a varios factores, incluyendo la pureza del ADN, la eficiencia de la PCR previa a la secuenciación, la amplificación inespecífica y las condiciones del proceso de secuenciación en sí. Las secuencias ideales deben mostrar picos altos y estrechos, bien separados entre sí. Sin embargo, en muchas de las secuencias analizadas se observó un solapamiento significativo de los picos, lo que dificulta la lectura e interpretación de las secuencias.

Análisis del Alineamiento:

A pesar de la baja calidad de las secuencias obtenidas, el análisis con VectorBuilder permitió identificar cambios en las bases enfocándose en la región correspondiente a la mutación 1660C>T en el gen SDHA. Sin embargo, estos resultados no son concluyentes debido al solapamiento de los picos en los electroferogramas, lo que impide confirmar de manera definitiva la mutación o el estado heterocigoto. Aunque los cambios en las bases son visibles, se requiere una secuenciación más precisa para validar los hallazgos y asegurar la integridad de los resultados.

Ejemplo del Análisis de Resultados de Secuenciación y Alineamiento:

Clon 30:

En el clon 30, el análisis de secuenciación reveló un solapamiento significativo de picos en las secuencias obtenidas, especialmente a partir de la base 270. Este solapamiento dificulta la lectura clara de la secuencia y no permite confirmar con precisión la presencia de la mutación 1660C>T. Aunque se observa una posible T superpuesta a una C en la posición esperada de la mutación, los resultados no son concluyentes debido a la calidad inconsistente de la secuencia obtenida (Figura 8).

El alineamiento de la secuencia del clon 30 utilizando la herramienta VectorBuilder mostró un cambio en la posición 1660C>T, donde se identificó una T en lugar de una C (Figura 9). Sin embargo, debido a la presencia de picos solapados en el electroferograma, no se puede afirmar con certeza que este clon sea heterocigoto.

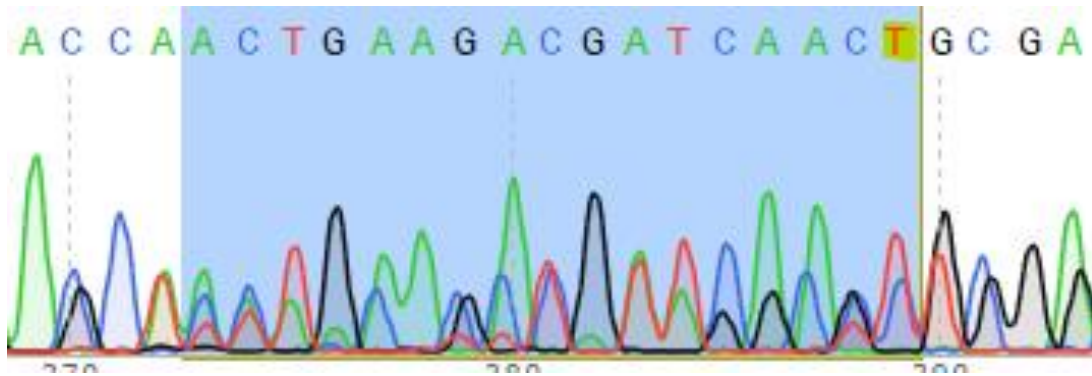


Figura 8. Representación gráfica con SnapGene Viewer de la secuenciación del Clon 30, donde se observa un pico de C solapado a un pico mayor de T en la posición que correspondería a la mutación (Sombreado amarillo).

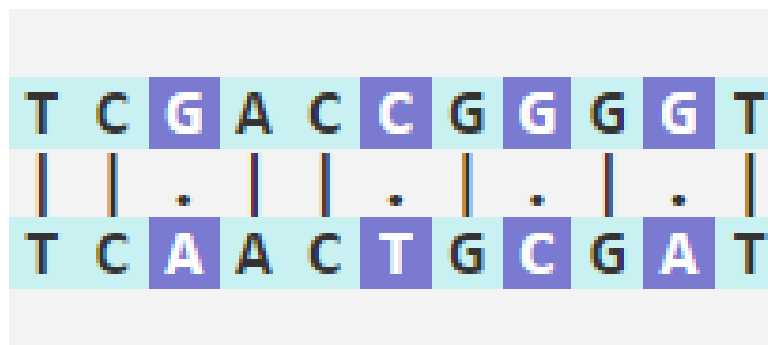


Figura 9. Alineamiento empleando VectorBuilder del Clon 30 en la zona de interés (Abajo, mutación 1660 C>T), con respecto a la secuencia de referencia de SDHA sin mutar (arriba).

Otros Clones:

En los clones 2, 18, 21, 36 y 57, los resultados de la secuenciación mostraron problemas similares de solapamiento de picos, lo que impidió una lectura precisa de la mutación 1660C>T. Aunque las secuencias eran más legibles que en otros clones, el solapamiento observado no permitió confirmar de manera concluyente la presencia de la mutación, ya que no se obtuvo una secuencia limpia y clara en los electroferogramas.

Resultados de la Secuenciación:

Los resultados obtenidos de la secuenciación indicaron que la calidad de las secuencias fue insuficiente para realizar un análisis detallado y preciso. En los clones 30, 36 y 57, el solapamiento de picos fue evidente en las posiciones clave de la mutación, lo que impidió confirmar de manera clara la introducción de la mutación 1660C>T en el gen SDHA. La presencia de este solapamiento obstaculizó la correcta identificación de las bases en dichas posiciones, impidiendo la distinción entre los alelos mutados y los de tipo salvaje. Esto dejó los resultados de la secuenciación inconclusos para evaluar si los clones presentan la mutación esperada o si son heterocigotos. El problema de la baja calidad de las secuencias sugiere que los resultados obtenidos no son suficientes para sacar conclusiones definitivas sobre la edición genética en estos clones.

A pesar de ello, estos resultados proporcionan una base para futuras investigaciones, permitiendo la identificación de clones potencialmente editados que pueden ser utilizados para estudios posteriores sobre el síndrome de Leigh y otras enfermedades mitocondriales. La repetición de la secuenciación y el uso de técnicas complementarias serán esenciales para validar estos hallazgos y asegurar la precisión de la edición genética realizada.

La identificación y corrección de las causas subyacentes de la baja calidad de la secuenciación, como posibles contaminaciones o ineficiencias en la PCR, serán cruciales para mejorar los futuros estudios y aplicaciones clínicas de CRISPR/Cas9.

5. Discusión:

5.1. Heterocigosidad y Comparación con Estudios Previos:

La observación de secuencias solapadas no permite confirmar con certeza la heterocigosidad en los clones analizados debido a la calidad insuficiente de la secuenciación. Aunque lo que se busca es obtener clones homocigotos para estudiar la función de la proteína mutante sin la influencia de la copia de tipo salvaje, el análisis de clones heterocigotos podría resultar interesante en caso de que, tras un análisis completo y con resultados más concluyentes, solo se obtuvieran clones heterocigotos. Estos clones podrían proporcionar información valiosa sobre cómo interactúan el alelo mutante y el de tipo salvaje en el contexto del síndrome de Leigh.

Si bien el enfoque principal sigue siendo la creación de clones homocigotos, los clones heterocigotos podrían ser de utilidad para estudiar cómo la presencia simultánea de ambos alelos afecta la función del complejo II de la cadena respiratoria mitocondrial. Por tanto, en caso de que los futuros análisis mostraran únicamente clones heterocigotos, su estudio ofrecería una perspectiva adicional sobre la biología de esta mutación.

La heterocigosidad es un concepto central en genética con importantes implicaciones para la biología celular y las enfermedades genéticas. En términos simples, un individuo o célula heterocigota para un gen específico posee dos alelos diferentes en una posición particular del genoma: uno de tipo salvaje y otro mutante [41]. En este estudio, la identificación de clones heterocigotos, donde coexisten una copia mutante y una copia de tipo salvaje del gen SDHA, sugiere que la edición genética mediante CRISPR/Cas9 fue exitosa en una de las copias del gen.

Esto tiene múltiples implicaciones. Primero, proporciona información sobre la dominancia o recesividad de la mutación. En mutaciones dominantes, una sola copia del alelo mutante puede causar un fenotipo observable, mientras que las mutaciones recesivas generalmente requieren dos copias del alelo mutante para manifestar el fenotipo [41].

Además, la funcionalidad de la proteína codificada por el gen SDHA podría verse afectada por la heterocigosidad. Una copia de tipo salvaje del gen podría permitir cierta funcionalidad residual del complejo II de la cadena respiratoria mitocondrial, moderando los efectos de la mutación. Esto es relevante para el diseño de terapias que podrían enfocarse en potenciar la función del alelo de tipo salvaje o corregir específicamente el alelo mutante. En resumen, los clones heterocigotos ofrecen un valioso modelo para estudiar cómo la mutación 1660C>T impacta en la función del gen SDHA.

La baja calidad en el resultado experimental, subraya la importancia de la optimización de condiciones experimentales para la edición genética. Factores como la eficiencia de la transfección, la actividad de la Cas9 y la especificidad de las guías gRNA juegan un papel crucial en el resultado final de la edición genética. Además, estos resultados resaltan la necesidad de utilizar técnicas de secuenciación de alta fidelidad y análisis bioinformáticos precisos para evaluar y confirmar las mutaciones introducidas.

En este estudio, hemos utilizado la técnica CRISPR/Cas9 para tratar de introducir la mutación 1660C>T en el gen SDHA en células 143-B, con el objetivo de crear un

modelo celular para estudiar el síndrome de Leigh. Comparando nuestros resultados con estudios previos, observamos varias similitudes y diferencias que destacan la relevancia y los desafíos de nuestra investigación.

Varios estudios han demostrado la eficacia de la tecnología CRISPR/Cas9 para introducir mutaciones específicas en diversos genes. Por ejemplo, Gammage y colaboradores lograron eliminar casi por completo el ADN mitocondrial mutado en células humanas utilizando nucleasas específicas para mitocondrias [42]. Este estudio resalta la capacidad de CRISPR/Cas9 para realizar ediciones precisas y eficientes en el genoma mitocondrial.

Además, investigaciones como la de Zhang y colaboradores han demostrado la utilidad de CRISPR/Cas9 en modelos de enfermedades genéticas. En su estudio, se introdujeron mutaciones en el gen DMD para estudiar la distrofia muscular de Duchenne en células madre humanas, proporcionando un modelo para investigar los mecanismos de la enfermedad y probar posibles terapias [13]. Estos resultados son comparables a nuestro enfoque en el síndrome de Leigh, donde la posible introducción de la mutación 1660C>T permite la creación de un modelo celular relevante para estudios posteriores.

Otro estudio relevante es el de Rahman y colaboradores, que investigó las características clínicas y bioquímicas del síndrome de Leigh asociado con diversas mutaciones genéticas [2]. Aunque este estudio se centró en la caracterización clínica y no en la edición genética, proporciona un contexto valioso sobre la importancia de modelar estas mutaciones en sistemas celulares para entender mejor la patogénesis de la enfermedad.

La observación de secuencias solapadas en nuestros clones, aunque no concluyente, guarda cierta relación con los estudios de Parfait y colaboradores, quienes identificaron mutaciones heterocigotas compuestas en pacientes con el síndrome de Leigh [44]. Sin embargo, debido a la calidad insuficiente de nuestros resultados de secuenciación, no es posible determinar de manera concluyente si los clones presentan heterocigosidad. Este hecho resalta la importancia de realizar un análisis más exhaustivo para confirmar la naturaleza de las mutaciones en ambos alelos y su impacto en el fenotipo clínico.

En conclusión, nuestros experimentos complementan y amplían los hallazgos de estudios previos, demostrando la viabilidad y utilidad de CRISPR/Cas9 para la edición genética precisa en modelos celulares de enfermedades mitocondriales. Este enfoque no solo permite una mejor comprensión de las bases moleculares del síndrome de Leigh, sino que también ofrece una plataforma para desarrollar y probar nuevas estrategias terapéuticas.

5.2. Limitaciones del Estudio:

A pesar de los avances significativos logrados en este estudio, existen varias limitaciones que deben ser reconocidas y consideradas al interpretar los resultados y al planificar futuras investigaciones (Tabla 2). Estas limitaciones se centran en aspectos técnicos, biológicos y experimentales, los cuales pueden influir en la reproducibilidad y la aplicabilidad de los hallazgos obtenidos.

En primer lugar, la eficiencia de edición genética utilizando la tecnología CRISPR/Cas9 puede variar significativamente entre diferentes tipos celulares y condiciones experimentales. Aunque se logró una tasa de edición aceptable en las células 143-B, la eficiencia de corte y la introducción de la mutación 1660C>T en el gen SDHA variaron entre los diferentes experimentos. En algunos casos, el proceso fue más eficiente, mientras que en otros la edición genética fue menos efectiva. Factores como la transfección, la expresión de Cas9 y la actividad del gRNA pueden influir en la eficiencia de la edición, y pequeñas variaciones en estos factores pueden llevar a resultados inconsistentes. Además, aunque se optimizaron las condiciones de electroporación, sigue existiendo variabilidad en la respuesta celular a este método de transfección.

En segundo lugar, el uso de una única línea celular como modelo experimental puede limitar la generalización de los resultados. Las células 143-B, aunque relevantes para el estudio del síndrome de Leigh, no representan completamente la diversidad celular del organismo humano. Diferencias en la susceptibilidad a la edición genética y en la respuesta a la mutación introducida pueden surgir en otros tipos celulares, lo que podría influir en la relevancia clínica de los hallazgos. Además, la mutación específica 1660C>T en el gen SDHA, aunque relevante para el síndrome de Leigh, representa solo una de las muchas posibles mutaciones que pueden ocurrir en este y otros genes mitocondriales.

En tercer lugar, la técnica de edición genética CRISPR/Cas9, puede dar lugar a efectos fuera del objetivo (off-target effects). Estos efectos, donde la Cas9 corta en sitios no deseados del genoma, pueden introducir mutaciones adicionales que no fueron planificadas ni deseadas. Aunque se realizaron secuenciaciones para verificar la presencia de la mutación específica, no se llevó a cabo un análisis exhaustivo de posibles efectos fuera del objetivo en todo el genoma. Esto podría resultar en artefactos que compliquen la interpretación de los resultados y su aplicación en un contexto terapéutico. Para analizar los efectos fuera del objetivo (off-targets) en la edición genética CRISPR/Cas9, es necesario realizar estudios adicionales como la secuenciación del genoma completo (WGS) para detectar mutaciones no planificadas. También pueden utilizarse técnicas específicas como Digenome-seq o GUIDE-seq, que mapean los sitios off-target con precisión, y herramientas bioinformáticas como CRISPResso2 para predecir potenciales sitios afectados. Posteriormente, estos sitios deben validarse mediante PCR o secuenciación dirigida para confirmar la presencia de mutaciones fuera del objetivo y garantizar la seguridad de la edición genética.

Además, la técnica del ensayo T7, empleada para evaluar la eficiencia de las guías CRISPR/Cas9, presenta limitaciones en cuanto a su sensibilidad y especificidad. Aunque útil para detectar la presencia de cortes en el ADN, el ensayo T7 puede no detectar todas las ediciones o proporcionar una cuantificación precisa de la eficiencia de edición. La utilización de métodos más avanzados y sensibles, como la secuenciación de nueva generación (NGS), podría proporcionar una evaluación más completa y precisa de los resultados de edición genética.

Para mejorar la precisión en la identificación de mutaciones, una técnica efectiva sería la segregación de alelos mediante clonación del producto de PCR en un plásmido. Este proceso implica la inserción de cada alelo en un plásmido individual, permitiendo que las bacterias amplifiquen una única copia de ADN. A partir de la selección de colonias bacterianas, se puede secuenciar cada alelo por separado, eliminando el problema del solapamiento de picos observado en la secuenciación inicial. Esta metodología facilitaría la confirmación de la presencia de alelos mutados y no mutados con mayor claridad, proporcionando resultados concluyentes sobre el estado de los clones analizados. La segregación de alelos es una herramienta crucial en estudios de edición genética, ya que permite validar si un clon es heterocigoto o homocigoto y asegura que no existan mutaciones no deseadas.

Finalmente, la variabilidad experimental, inherente a los procedimientos de transfección y electroporación, puede afectar la reproducibilidad de los resultados. Las diferencias en la respuesta celular a estos métodos pueden generar inconsistencias que dificultan la comparación entre experimentos y la extrapolación de los resultados a un contexto más amplio.

En resumen, aunque este estudio ha demostrado la viabilidad de utilizar CRISPR/Cas9 para introducir la mutación 1660C>T en el gen SDHA en células 143-B, varias limitaciones técnicas y biológicas deben ser abordadas en futuras investigaciones para mejorar la reproducibilidad, la eficiencia y la aplicabilidad clínica de estos hallazgos (Tabla 3). Una mayor comprensión y mitigación de estas limitaciones contribuirán al avance de las aplicaciones terapéuticas de la edición genética en enfermedades mitocondriales.

Tabla 3. Resumen de las principales limitaciones del estudio y sus posibles implicaciones:

Categoría	Limitación	Descripción
Eficiencia de Edición	Variabilidad en la eficiencia de corte y edición	La eficiencia de CRISPR/Cas9 puede variar entre diferentes tipos celulares y condiciones experimentales.
Modelo Celular	Uso de una única línea celular	Las células 143-B, aunque relevantes, no representan la diversidad celular del organismo humano.
Efectos Fuera del Objetivo	Posibles efectos fuera del objetivo (off-target effects)	La Cas9 puede cortar en sitios no deseados del genoma, introduciendo mutaciones adicionales no planificadas.
Detección de Mutaciones	Sensibilidad y especificidad limitada del ensayo T7	El ensayo T7 puede no detectar todas las ediciones o proporcionar una cuantificación precisa de la eficiencia de edición.
Variabilidad Experimental	Variabilidad en la respuesta celular a la transfección y electroporación	La respuesta a los métodos de transfección puede variar, afectando la reproducibilidad de los resultados.
Relevancia Clínica	Mutación específica estudiada no representa todas las posibles mutaciones en genes mitocondriales	La mutación 1660C>T en el gen SDHA es solo una de muchas posibles mutaciones, limitando la generalización de los hallazgos.
Validación de Resultados	Necesidad de validación adicional mediante técnicas más sensibles, como la secuenciación de nueva generación	Las técnicas más sensibles podrían proporcionar una imagen más completa y precisa de la eficiencia y especificidad de la edición.

5.3. Implicaciones Clínicas y Futuras Investigaciones:

Las implicaciones clínicas y las futuras investigaciones derivadas de este estudio son de gran relevancia para el tratamiento de enfermedades mitocondriales como el síndrome de Leigh. La capacidad de editar genomas con precisión mediante CRISPR/Cas9 abre nuevas posibilidades para la terapia génica, permitiendo la corrección de mutaciones causantes de enfermedades. Este avance podría traducirse en tratamientos más efectivos y personalizados para pacientes con enfermedades mitocondriales, mejorando significativamente su calidad de vida. Además, el uso de CRISPR/Cas9 no solo se limita a enfermedades mitocondriales, sino que también puede ser aplicado en una amplia gama de desórdenes genéticos, abriendo un abanico de posibilidades terapéuticas.

Futuras investigaciones deberían enfocarse en mejorar la eficiencia y especificidad de la tecnología CRISPR/Cas9. Esto incluye la optimización de guías de RNA (gRNA) para minimizar efectos fuera del objetivo y aumentar la tasa de edición en células diana. Además, el desarrollo de nuevas técnicas de detección y análisis de mutaciones, como la secuenciación de nueva generación, permitirá una evaluación más precisa y exhaustiva de los resultados de la edición genética, asegurando la seguridad y eficacia de las intervenciones terapéuticas. Es crucial también explorar combinaciones de tecnologías, como el uso de inhibidores de la reparación de ADN no deseada, para incrementar la precisión de las ediciones genéticas.

La creación de modelos celulares más representativos de la diversidad genética y celular del organismo humano es otro objetivo crucial. Utilizar diferentes tipos celulares en los estudios permitirá una comprensión más amplia de cómo las mutaciones y su corrección afectan distintos tejidos y sistemas. Este enfoque integral puede conducir a estrategias terapéuticas más efectivas y adaptadas a las necesidades específicas de cada paciente. Además, el uso de organoides y modelos animales más avanzados podría proporcionar información adicional sobre los efectos a largo plazo y la seguridad de las ediciones genéticas.

En términos de aplicación clínica, es esencial realizar estudios preclínicos y clínicos para evaluar la seguridad y eficacia de las terapias basadas en CRISPR/Cas9. Estos estudios deben incluir una monitorización a largo plazo de los pacientes para detectar posibles efectos adversos y evaluar la durabilidad de las correcciones genéticas. La colaboración entre investigadores, médicos y empresas biotecnológicas será fundamental para trasladar estos avances del laboratorio a la clínica, asegurando que los pacientes se beneficien de las nuevas terapias de manera segura y efectiva. Asimismo, es importante desarrollar protocolos estándar y procedimientos operativos para la implementación clínica de la edición genética.

La integración de CRISPR/Cas9 en la práctica clínica también requiere un marco regulatorio robusto y políticas éticas claras para abordar los desafíos relacionados con la edición genética humana. Las investigaciones futuras deben considerar estos aspectos y trabajar en conjunto con las autoridades reguladoras para establecer directrices que garanticen la seguridad y la responsabilidad en el uso de estas tecnologías. Es imperativo incluir a los pacientes y al público en general en el debate sobre la edición genética para asegurar la aceptación social y ética de estas intervenciones.

Por ende, las implicaciones clínicas de este estudio son prometedoras, pero requieren un esfuerzo continuo en investigación y desarrollo para superar las limitaciones actuales. La tecnología CRISPR/Cas9 tiene el potencial de transformar el tratamiento

de enfermedades genéticas, y futuras investigaciones deben centrarse en perfeccionar esta herramienta y ampliar su aplicación en medicina. Esto incluye no solo mejorar la técnica en sí, sino también establecer sistemas de apoyo y regulación que permitan una implementación segura y ética en el entorno clínico. La colaboración interdisciplinaria y el diálogo abierto serán esenciales para aprovechar al máximo el potencial de CRISPR/Cas9 y asegurar que sus beneficios lleguen a todos los que los necesitan.

6. CONCLUSIÓN:

Aunque se intentó introducir la mutación 1660C>T en el gen SDHA de las células 143-B, los resultados de secuenciación fueron inconclusos debido a la baja calidad de las secuencias obtenidas. No se puede confirmar con precisión la presencia de la mutación, ni afirmar que se lograron clones heterocigotos. Este trabajo subraya la importancia de optimizar los procesos de secuenciación y transfección para asegurar la fiabilidad de la edición genética y el éxito en futuros experimentos.

- **Desarrollo exitoso de reactivos de edición:** Se diseñaron y sintetizaron guías de RNA (gRNA) específicas y un oligo donante para introducir de manera precisa la mutación 1660C>T en el gen SDHA, demostrando un adecuado diseño de los reactivos para la edición genética mediante CRISPR/Cas9.

Edición genética confirmada mediante PCR específica: Se logró introducir la mutación 1660C>T en el gen SDHA de las células 143-B utilizando la tecnología CRISPR/Cas9, lo cual fue confirmado mediante PCR positiva con oligos específicos para la mutación.

- **Secuenciación inconclusa:** No fue posible validar la heterocigosidad de los clones debido a la baja calidad de las secuencias. La presencia de solapamientos impide determinar si ambas copias del gen SDHA están afectadas. Este estudio, por tanto, no confirma la generación de clones heterocigotos, y se requiere un análisis más exhaustivo para concluir.
- **Optimización necesaria:** Las fases de transfección y secuenciación requieren mejoras para evitar solapamientos y mejorar la claridad de las secuencias. La repetición de estos pasos y la purificación adecuada del ADN serán esenciales para asegurar la fiabilidad y reproducibilidad de los resultados en futuros experimentos
- **Importancia del modelo celular:** Aunque los resultados fueron inconclusos, las líneas celulares 143-B utilizadas en este estudio siguen representando un modelo útil para la investigación de la edición genética y podrían ser una herramienta importante en la investigación futura de enfermedades mitocondriales, siempre y cuando se optimicen los procesos involucrados. Además, la disponibilidad de clones específicos, como los números 30, 36 y 57, permite realizar estudios repetidos bajo condiciones controladas, lo que asegura la reproducibilidad de los resultados y facilita la identificación de correlaciones entre la mutación genética y las alteraciones fenotípicas observadas.

BIBLIOGRAFÍA:

1. DiMauro, S., & Schon, E. A. (2003). Mitochondrial respiratory-chain diseases. *New England Journal of Medicine*, 348(26), 2656-2668. <https://doi.org/10.1056/NEJMra022567>
2. Rahman, S., Blok, R. B., Dahl, H. H., Danks, D. M., Kirby, D. M., Chow, C. W., Christodoulou, J., & Thorburn, D. R. (1996). Leigh syndrome: clinical features and biochemical and DNA abnormalities. *Annals of Neurology*, 39(3), 343-351. <https://doi.org/10.1002/ana.410390311>
3. Parfait, B., Chretien, D., Rötig, A., Marsac, C., Munnich, A., & Rustin, P. (2000). Compound heterozygous mutations in the flavoprotein gene of the respiratory chain complex II in a patient with Leigh syndrome. *Human Genetics*, 106(2), 236-243. <https://doi.org/10.1007/s004399900218>
4. Freyer, C., Cree, L. M., Mourier, A., Stewart, J. B., Koolmeister, C., Milenkovic, D., ... & Larsson, N. G. (2012). Variation in germline mtDNA heteroplasmy is determined prenatally but modified during subsequent transmission. *Nature Genetics*, 44(11), 1282-1285. <https://doi.org/10.1038/ng.2427>
5. Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2014). The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, 346(6213), 1258096. <https://doi.org/10.1126/science.1258096>
6. Gammage, P. A., Van Haute, L., & Minczuk, M. (2016). Engineered mtZFNs for Manipulation of Human Mitochondrial DNA Heteroplasmy. En *Methods in molecular biology* (pp. 145-162). https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3040-1_11
7. Villar, L. P. (2020, 17 febrero). El sistema CRISPR/Cas9. Reproducción Asistida ORG. <https://www.reproduccionasistida.org/autorizacion-de-modificacion-de-embryones/sistema-crispr-cas9/>
8. Complejo II. (s. f.). https://biomodel.uah.es/metab/mitoc/mitoE_cII.htm
9. Mali, P., Yang, L., Esvelt, K. M., Aach, J., Guell, M., DiCarlo, J. E., ... & Church, G. M. (2013). RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*, 339(6121), 823-826. <https://doi.org/10.1126/science.1232033>
10. Ran, F. A., Hsu, P. D., Lin, C. Y., Gootenberg, J. S., Konermann, S., Trevino, A. E., ... & Zhang, F. (2013). Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell*, 154(6), 1380-1389. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.08.021>

11. Yang, H., Wang, H., Shivalila, C. S., Cheng, A. W., Shi, L., & Jaenisch, R. (2013). One-Step Generation of Mice Carrying Reporter and Conditional Alleles by CRISPR/Cas-Mediated Genome Engineering. *Cell*, *154*(6), 1370-1379. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.08.022>
12. Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, *337*(6096), 816-821. <https://doi.org/10.1126/science.1225829>
13. Cong, L., Ran, F. A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., ... & Zhang, F. (2013). Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, *339*(6121), 819-823. <https://doi.org/10.1126/science.1231143>
14. Wai, T., Teoli, D., & Shoubridge, E. A. (2008). The mitochondrial DNA genetic bottleneck results from replication of a subpopulation of genomes. *Nature Genetics*, *40*(12), 1484-1488. <https://doi.org/10.1038/ng.258>
15. Leigh, D. (1951). Subacute necrotizing encephalomyelopathy in an infant. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, *14*(3), 216-221. <https://doi.org/10.1136/jnnp.14.3.216>
16. Calvo, S. E., Compton, A. G., Hershman, S. G., Lim, S. C., Lieber, D. S., Tucker, E. J., ... & Mootha, V. K. (2012). Molecular diagnosis of infantile mitochondrial disease with targeted next-generation sequencing. *Science Translational Medicine*, *4*(118), 118ra10. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3003310>
17. Ortigoza-Escobar, J. D., Oyarzabal, A., Montero, R., Artuch, R., Jou, C., Jiménez, C., Gort, L., Briones, P., Muchart, J., López-Gallardo, E., Emperador, S., Pesini, E. R., Montoya, J., Pérez, B., Rodríguez-Pombo, P., & Pérez-Dueñas, B. (2016). Ndufs4 related Leigh syndrome: A case report and review of the literature. *Mitochondrion*, *28*, 73-78. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2016.04.001>
18. Suomalainen, A., & Isohanni, P. (2010). Mitochondrial DNA depletion syndromes—many genes, common mechanisms. *Neuromuscular Disorders*, *20*(7), 429-437. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2010.03.017>
19. DiMauro, S., Hirano, M., & Schon, E. A. (2006). Approaches to the treatment of mitochondrial diseases. *Muscle & Nerve*, *34*(3), 265-283. <https://doi.org/10.1002/mus.20598>

20. Mansouri, A., Gattolliat, C., & Asselah, T. (2018). Mitochondrial Dysfunction and Signaling in Chronic Liver Diseases. *Gastroenterology*, 155(3), 629-647. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2018.06.083>
21. King, M. P., & Attardi, G. (1989). Human cells lacking mtDNA: Repopulation with exogenous mitochondria by complementation. *Science*, 246(4929), 500-503. <https://doi.org/10.1126/science.2814477>
22. Hajnóczky, G., Csordás, G., Das, S., Garcia-Perez, C., Saotome, M., Roy, S. S., & Yi, M. (2006). Mitochondrial calcium signalling and cell death: Approaches for assessing the role of mitochondrial Ca²⁺ uptake in apoptosis. *Cell Calcium*, 40(5-6), 553-560. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2006.08.016>
23. Greaves, L. C., & Taylor, R. W. (2006). Mitochondrial DNA mutations in human disease. *IUBMB Life*, 58(3), 143-151. <https://doi.org/10.1080/15216540600686888>
24. Freshney, R. I. (2010). *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications*. <http://ci.nii.ac.jp/ncid/BB0403391X>
25. Eagle, H. (1955). Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture. *Science*, 122(3168), 501-504. <https://doi.org/10.1126/science.122.3168.501>
26. GeneArt Precision gRNA Synthesis Kit Manual. Thermo Fisher Scientific. https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0017200_GeneArt_Precision_gRNA_Synthesis_UG.pdf
27. Neumann, E., Schaefer-Ridder, M., Wang, Y., & Hofschneider, P. (1982). Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields. *EMBO Journal*, 1(7), 841-845. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1982.tb01257.x>
28. Jordan, E. T., Collins, M., Terefe, J., Ugozzoli, L., & Rubio, T. (2008). Optimizing electroporation conditions in primary and other difficult-to-transfect cells. *PubMed*. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19183796>
29. Potter, H., & Heller, R. (2003). Transfection by electroporation. *Current Protocols in Molecular Biology*, Chapter 9, Unit 9.3. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb0903s62>
30. Considerations for T7 Endonuclease I (T7EI) Mismatch Assays. Horizon Discovery. <https://horizon-discovery.com/en/resources/featured-articles/considerations-for-t7-endonuclease-i-t7ei-mismatch-assays>
31. Mullis, K., & Faloona, F. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology*, 155, 335-350. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(87\)55023-6](https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)55023-6)
32. Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A., & Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction

- site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230(4732), 1350-1354. <https://doi.org/10.1126/science.2999980>
33. Sambrook, J., & Russell, D. W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
 34. Freshney, R. I. (2010). *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications*. <http://ci.nii.ac.jp/ncid/BB0403391X>
 35. Gey, G. (1952). Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Research*, 12, 264-265. <https://ci.nii.ac.jp/naid/10006432514/>
 36. Green, M. R., & Sambrook, J. (2012). *Molecular cloning: A Laboratory Manual*.
 37. Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2014). The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, 346(6213), 1258096. <https://doi.org/10.1126/science.1258096>
 38. Cong, L., Ran, F. A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., ... & Zhang, F. (2013). Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 339(6121), 819-823. <https://doi.org/10.1126/science.1231143>
 39. Bibikova, M., Carroll, D., Segal, D. J., Trautman, J. K., Smith, J., Kim, Y. G., & Chandrasegaran, S. (2001). Stimulation of homologous recombination through targeted cleavage by chimeric nucleases. *Molecular and Cellular Biology*, 21(1), 289-297. <https://doi.org/10.1128/MCB.21.1.289-297.2001>
 40. Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 337(6096), 816-821. <https://doi.org/10.1126/science.1225829>
 41. Strachan, T., & Read, A. (2018). *Human Molecular Genetics*. Garland Science.
 42. Gammage, P. A., Gaude, E., Van Haute, L., Rebelo-Guiomar, P., Jackson, C. B., Rorbach, J., ... & Minczuk, M. (2016). Near-complete elimination of mutant mtDNA by iterative or dynamic dose-controlled treatment with mtZFNs. *Nucleic Acids Research*, 44(16), 7804-7816. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw676>
 43. Liang, P., Xu, Y., Zhang, X., Ding, C., Huang, R., Zhang, Z., Lv, J., Xie, X., Chen, Y., Li, Y., Sun, Y., Bai, Y., Songyang, Z., Ma, W., Zhou, C., & Huang, J. (2015). CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human tripronuclear zygotes. *Protein & Cell*, 6(5), 363-372. <https://doi.org/10.1007/s13238-015-0153-5>

44. Parfait, B., Chretien, D., Rötig, A., Marsac, C., Munnich, A., & Rustin, P. (2000). Compound heterozygous mutations in the flavoprotein gene of the respiratory chain complex II in a patient with Leigh syndrome. *Human Genetics*, 106(2), 236-243. <https://doi.org/10.1007/s004399900218>

45. Komor, A. C., Kim, Y. B., Packer, M. S., Zuris, J. A., & Liu, D. R. (2016). Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature*, 533(7603), 420-424. <https://doi.org/10.1038/nature17946>

7. ANEXOS:

Anexo 1: Manual del Kit de Síntesis de gRNA GeneArt™ Precision

- Enlace al manual: [GeneArt™ Precision gRNA Synthesis Kit Manual](#)

Anexo 2: Listado de Equipo Empleado

- **Electroforesis:**
 - Molecular Imager: Bio-Rad Gel Doc Xr
- **Electroporador por Neón:**
 - Electroporador: Gene Pulser Xcell
- **NanoDrop:**
 - NanoDrop: ND-1000.
- **Campana Flujo Laminar**
 - Campana Flujo Laminar: Telstar Micro H
- **Termociclador**
- **Centrífuga**
- **Cámara Cultivos Celulares**
- **Cámara frigorífica**
- **Microscopio de Campo Claro**
- **Cámara de Neubauer**
- **Ordenador IBGM**

Anexo 3: Secuencia de Referencia (SDHA) para alineamiento, 718 pb:

```
CAGTCTGCTTGGAGTCCTGGACCCTGGCTGTATCCTGCTGGAAAGGATGTGTGTG
GGTCTAAGATGTGTATGTAATAGAAACATTTATTTATTCAGAAGCTTTAGTCAAAACTT
CATTTTTAAGTTTGGAGTAATAAACTCATAGTCTGAATTTCTAATTTTTCTGTTTAAAT
TTATGTAACTTTTAAGTCAAATGCAAAACAACAGGTCTAAAAGTTAAGCAGTTCTTG
GTATGGCTGCTTCTATGGATTAAGTTTACAAATAATATTTTGTGCCACAGTCAATG
CAAATCATGCTGCCGTGTTCCGTGTGGGAAGCGTGTTGCAAGAAGGTTGTGGGA
AAATCAGCAAGCTCTATGGAGACCTAAAGCACCTGAAGACGTTTCGACCGGGGTGA
GCAGACAGTGGGCTCTGTGCACACTGTTGGGCCCTTCCTTCTGCAGGGTGGGCT
GGTGTCTGTCCCGTCAGTGCTGACTTAGTTCCGTGCTTGCTGTCTGGATGGGTCC
TGGCCCACAGCTATAAAGCCACAACAGTGACTCCATGGACTAGCAGGCCAGGC
TGACAGCTCGGAGGGCCCATGTGACTGGGTCCCGCCTGCCCTGATGGAACTTTT
```

TGTGTCCCCAGGAATGGTCTGGAACACGGACCTGGTGGAGACCCTGGAGCTGCA
GAACCTGATGCTGTGTGCGCTGCAGACCATCTACGGAGCAGAGGCAC

(Con posición de mutación remarcada)

Anexo 4: Figuras Adicionales y Esquema del Diseño Experimental

Figuras Adicionales

- Diagrama explicativo del proceso electroporación.

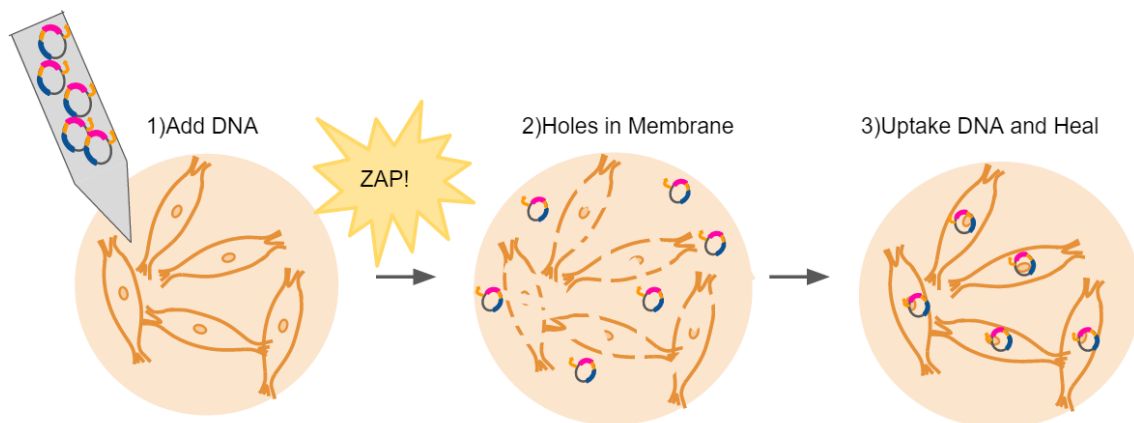


Diagrama electroporación (Team:MIT/Experiments/miRNA/More Experiments - 2016.igem.org, s. f.).

Esquema del diseño experimental:

1. Objetivos del Estudio

- Introducción de la mutación 1660C>T en el gen SDHA en células 143-B utilizando la herramienta CRISPR/Cas9.
- Evaluación de la eficiencia de edición y generación de clones celulares con la mutación.

2. Materiales y Métodos

- **Líneas Celulares y Cultivo**
 - Células U2OS y 143-B.
 - Condiciones de cultivo y mantenimiento.
- **Síntesis y Purificación de gRNA**
 - Diseño y síntesis de gRNA0 y gRNA1.
 - Purificación de gRNA utilizando el Kit GeneArt™ Precision.
- **Ensayo de T7**
 - Evaluación de la eficiencia de corte de gRNA en células U2OS.

- Análisis mediante PCR y electroforesis en gel de agarosa.
- **Electroporación y Condiciones Experimentales**
 - Preparación de células 143-B para electroporación.
 - Protocolo de electroporación utilizando el sistema Neon®.
 - Recuperación post-electroporación y cultivo de células.
- **PCR y Análisis Genético**
 - Extracción de ADN genómico.
 - PCR específica para detectar la mutación 1660C>T.
 - Análisis mediante electroforesis en gel de agarosa.
- **Dilución Límite y Clonación**
 - Aislamiento de clones individuales.
 - Expansión y análisis de clones seleccionados.
- **Secuenciación de Clones Mutados**
 - Preparación de muestras para secuenciación.
 - Análisis de datos de secuenciación utilizando software bioinformático.

3. Resultados Esperados

- Confirmación de la mutación 1660C>T en clones seleccionados.
- Evaluación de la eficiencia y precisión de la edición genética.
- Identificación de clones heterocigotos y homocigotos.

4. Interpretación de Resultados

- Análisis de la eficiencia de edición genética.
- Comparación con estudios previos y discusión de resultados.
- Identificación de limitaciones y propuestas de mejoras para futuros estudios.

5. Futuros Pasos

- Confirmación del estado heterocigoto u homocigoto de clones seleccionados.
- Segregación de alelos y secuenciación individual.
- Uso de líneas celulares mutadas para estudios adicionales y pruebas terapéuticas.

Anexo 5: Información de Software:

Software Empleados:

- **SnapGene Viewer:**
 - Versión 7.1.2 (Ordenador Personal)

- **Programa Nanodrop ND-1000:**
 - Versión 3.8.1 (Ordenador IBGM)
- **VectorBuilder:**
 - Plataforma en línea de uso gratuito (Ordenador Personal)
- **Quantity One (Electroforesis):**
 - Gel Doc XR (Ordenador IBGM)