

# 5. Métodos de validación y verificación de ediciones genéticas mediante CRISPR-Cas9

La validación de las modificaciones genéticas inducidas mediante CRISPR-Cas9 es una etapa esencial para confirmar que la edición se ha realizado correctamente, evaluar su eficiencia y descartar posibles efectos fuera del objetivo (off-target). Para ello, se emplea un conjunto complementario de técnicas moleculares, bioquímicas y funcionales que permiten analizar el ADN, el ARN y la proteína, así como la consecuencia fenotípica en las células editadas.

## 5.1. Análisis a nivel de ADN

### 5.1.1. PCR convencional y análisis mediante electroforesis en gel

La PCR permite amplificar la región diana flanqueada por cebadores específicos. Cuando la edición introduce inserciones o deleciones (indels), pueden observarse cambios en el tamaño del amplicón respecto al control no editado. Los fragmentos se separan por electroforesis en gel de agarosa y se visualizan mediante tinción con bromuro de etidio o GelRed.

### 5.1.2. PCR alelo-específica

Emplea cebadores diseñados para hibridar únicamente si la secuencia editada está presente (en el alelo mutado) o ausente (alelo salvaje). Permite discriminar entre alelos editados y no editados y proporciona una estimación inicial de la eficiencia de edición.

### 5.1.3. Secuenciación de Sanger

Es el método más utilizado para confirmar ediciones puntuales o pequeñas inserciones/deleciones en una región específica. El análisis del cromatograma permite identificar con precisión la naturaleza y localización de la mutación. En muestras heterocigotas, a partir del sitio de edición aparecen picos superpuestos debido a la mezcla de alelos.

### 5.1.4. Secuenciación de nueva generación (NGS)

Permite analizar miles de moléculas de ADN en paralelo, proporcionando información cuantitativa sobre la eficiencia de edición. Detecta mosaicismos, diferentes tipos de indels y variantes de baja frecuencia que no se identifican con Sanger. Es el estándar de referencia para una caracterización profunda de la edición.

### 5.1.5. Ensayo T7E1 (ensayo de desajuste)

Las indels generan heterodúplex de ADN al desnaturalizar y rehibridar las cadenas editadas y no editadas. La endonucleasa T7E1 reconoce estos desajustes y los corta. Los fragmentos resultantes se separan por electroforesis, permitiendo estimar el porcentaje de edición. Es un método rápido y económico, aunque no identifica el tipo exacto de mutación.

## 5.2. Análisis a nivel de ARN y proteína

### 5.2.1. qPCR (expresión génica)

La PCR cuantitativa en tiempo real permite medir los niveles de ARNm del gen diana. Es útil para evaluar si la edición produce cambios en la transcripción, especialmente en experimentos de knockout, activación o represión génica.

### 5.2.2. Western blot

Permite detectar y cuantificar la proteína codificada por el gen editado. En experimentos de knockout, se espera la ausencia o reducción significativa de la proteína; en ediciones puntuales, pueden observarse cambios en el tamaño aparente de la banda.

## 5.3. Reporteros fluorescentes y análisis funcional

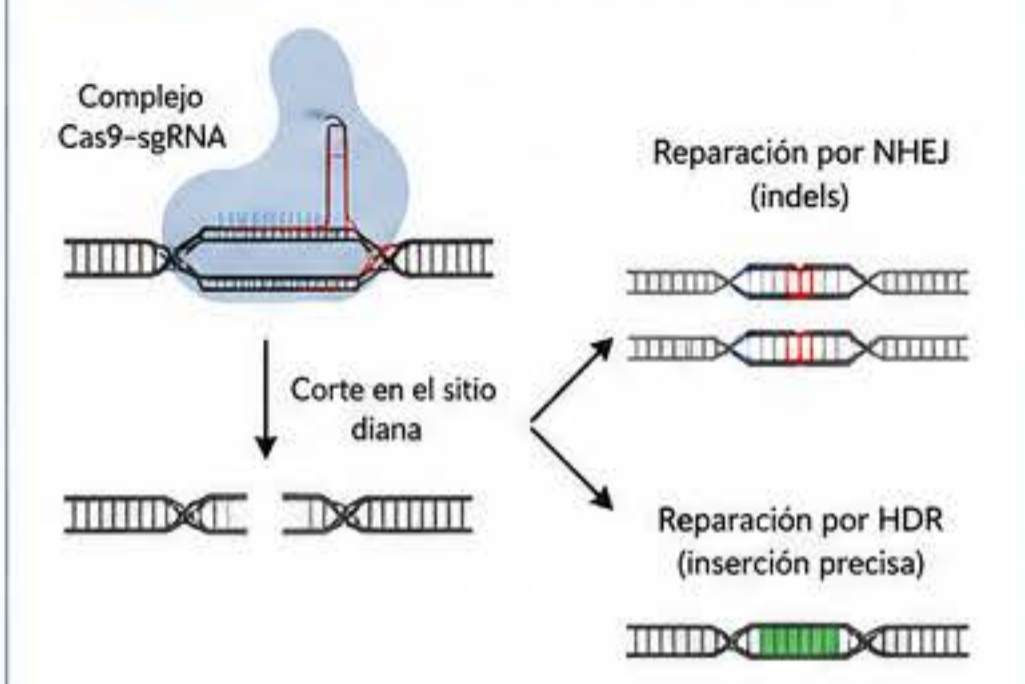
Cuando la edición introduce o activa un gen reportero (por ejemplo, GFP), la validación puede realizarse mediante microscopía de fluorescencia o citometría de flujo. Estas técnicas permiten identificar y cuantificar directamente las células editadas dentro de una población heterogénea.

## 5.4. Evaluación de efectos fuera del objetivo (off-target)

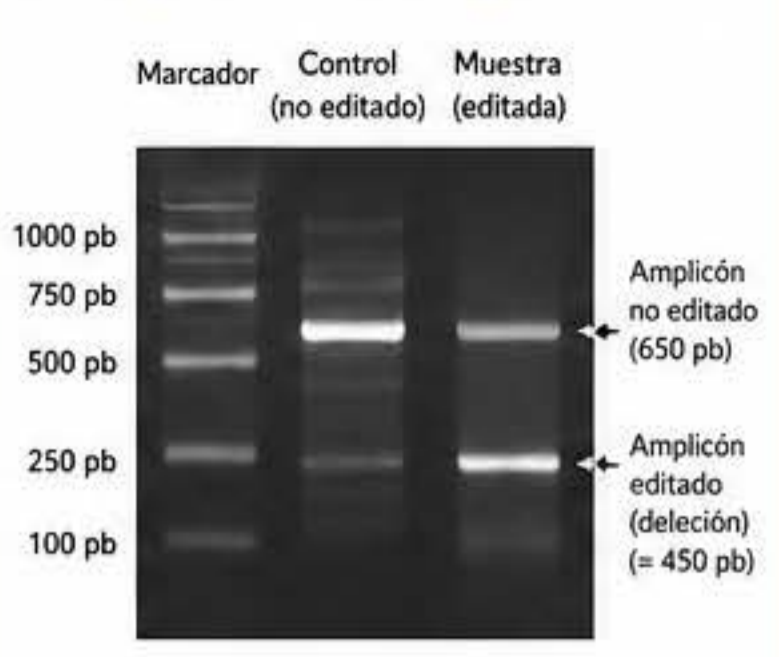
Para garantizar la especificidad del sistema CRISPR-Cas9, es fundamental analizar posibles cortes en sitios no deseados. Existen métodos experimentales específicos (GUIDE-seq, Digenome-seq, CIRCLE-seq) y aproximaciones globales como la secuenciación completa del genoma (WGS), que permiten identificar y cuantificar mutaciones off-target.

**En conjunto,** la combinación de estas técnicas permite una validación robusta y multidimensional de las ediciones genéticas, asegurando la precisión, eficacia y seguridad de la tecnología CRISPR-Cas9 en aplicaciones de investigación y potencialmente clínicas.

## 1. Esquema general de edición con CRISPR-Cas9

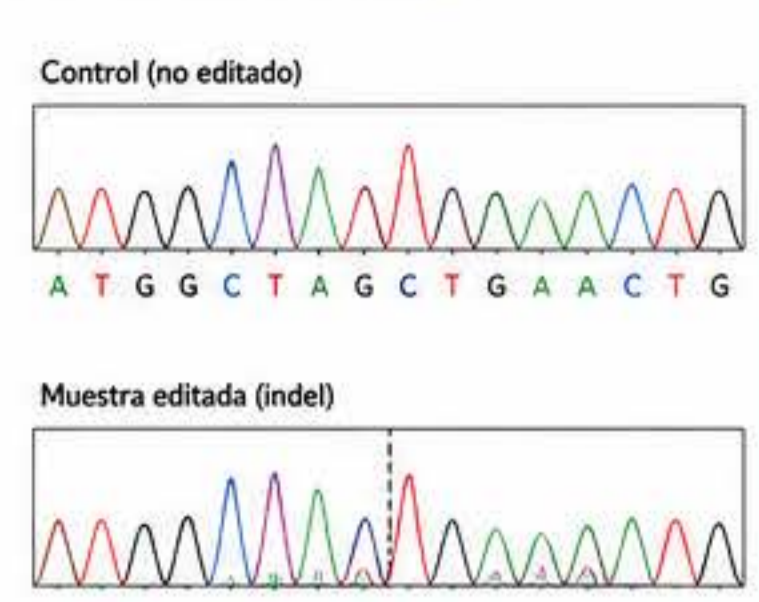


## 2. PCR y electroforesis en gel



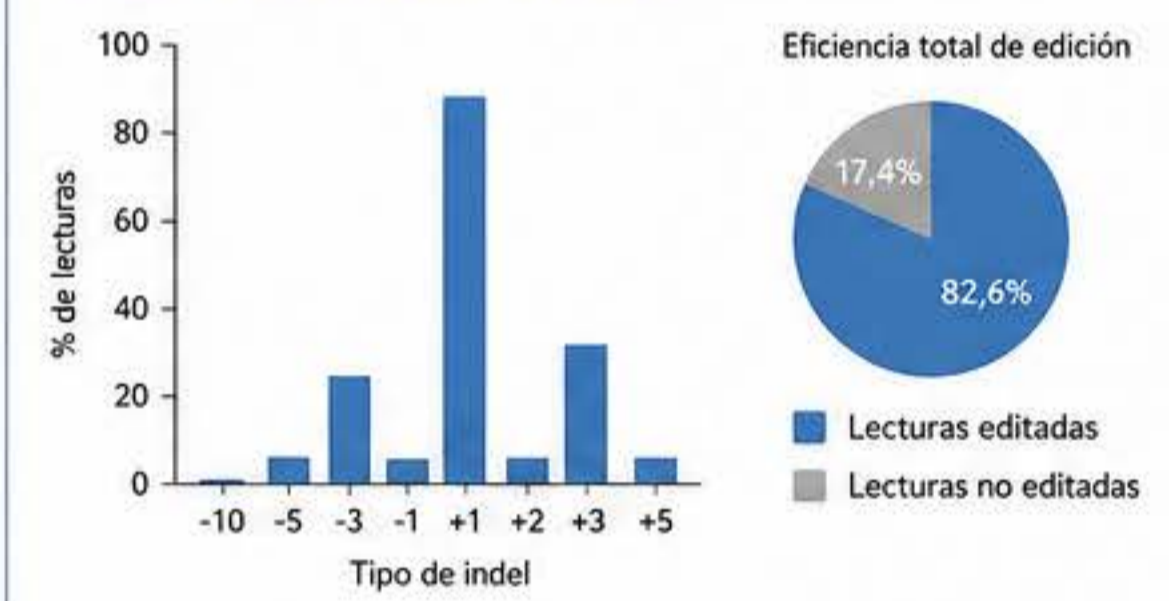
Diferencia de tamaño del amplicón tras la generación de una deleción.

## 3. Secuenciación de Sanger



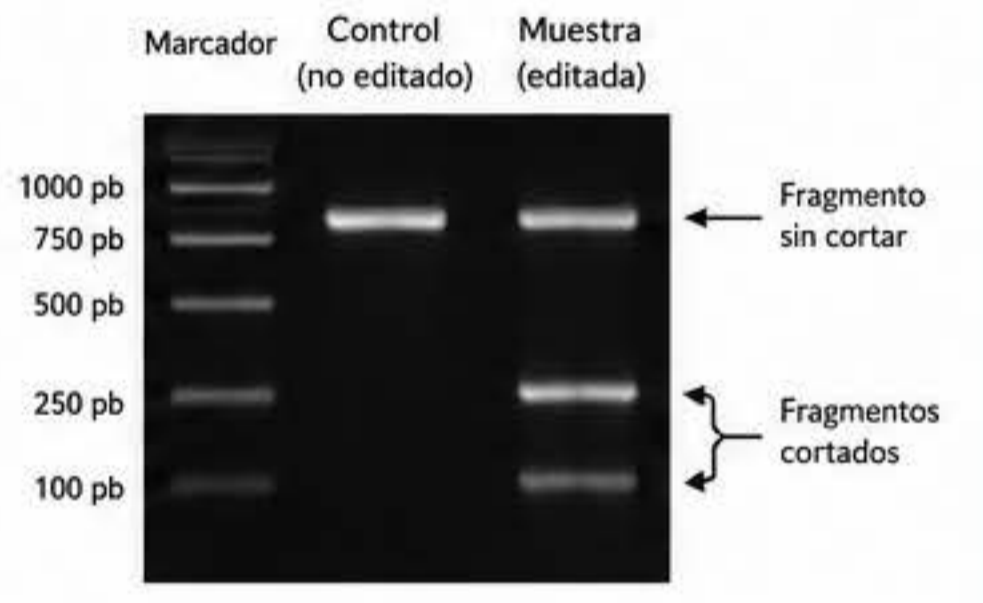
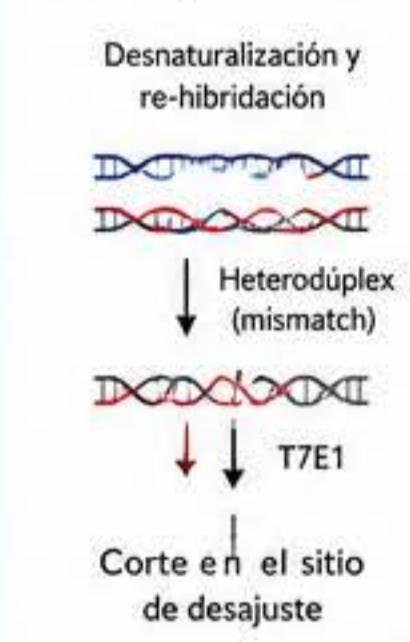
A partir del sitio de edición aparecen picos superpuestos debido a la mezcla de alelos (heterocigosis).

## 4. NGS: eficiencia de edición e indels



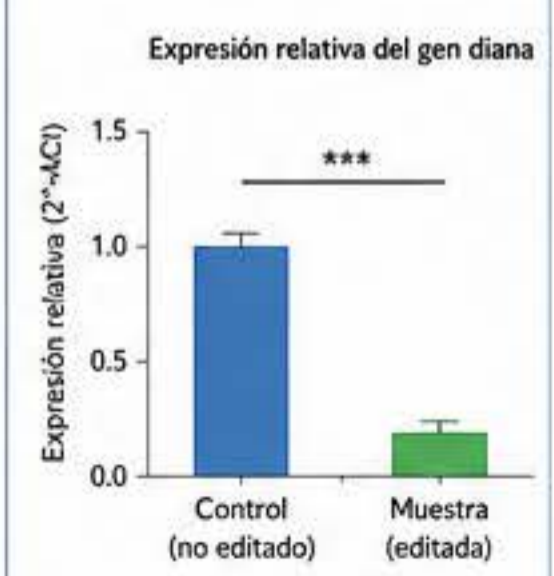
Ejemplo de análisis por NGS mostrando el porcentaje de lecturas editadas y la distribución de indels detectados.

## 5. Ensayo T7E1



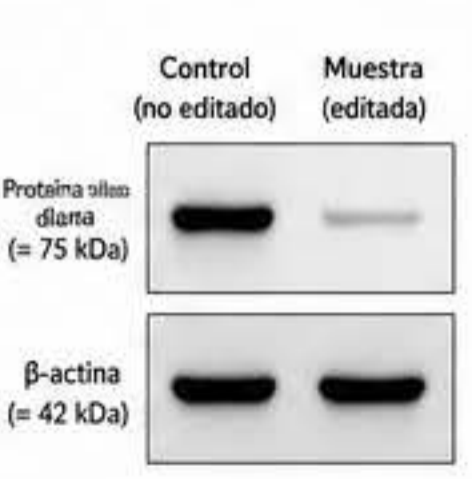
La presencia de fragmentos adicionales evidencia la existencia de indels.

## 6. qPCR (expresión génica)



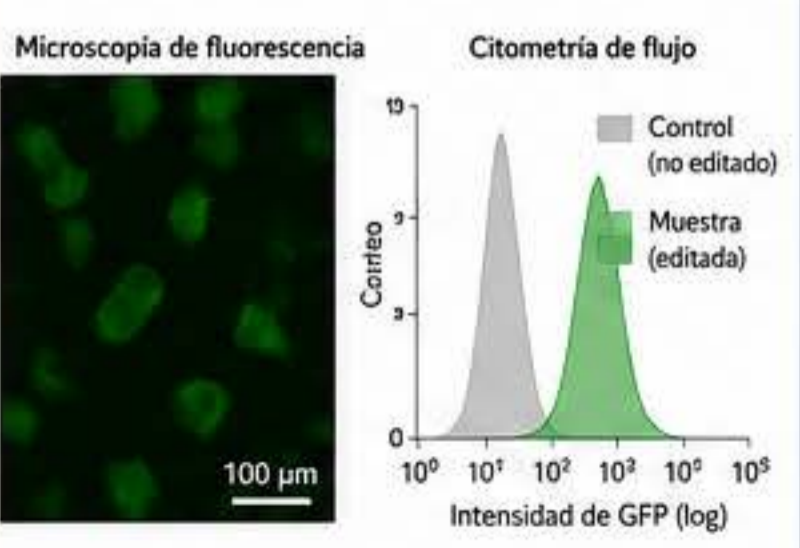
Reducción significativa de la expresión tras la edición (knockout).

## 7. Western blot



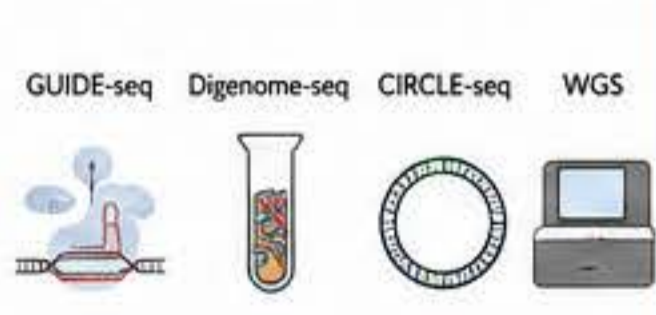
Ausencia o reducción de la proteína diana en la muestra editada.

## 8. Reportero fluorescente (GFP)



Detección y cuantificación de células positivas para GFP como indicativo de edición correcta.

## 9. Análisis off-target



Identificación de cortes fuera del objetivo y variantes no deseadas en todo el genoma.

La evaluación de off-target es esencial para garantizar la seguridad de la edición.