

Análisis retrospectivo de la técnica CRISPR-Cas: una herramienta metodológica con potencia para el diagnostico de enfermedades virales

INVESTIGADOR PRINCIPAL

JEIMY TATIANA RODRIGUEZ PINEDA

ASESOR

MAURICIO HUMBERTO RODRÍGUEZ PANDURO

UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA

Facultad de Ciencias de la Salud

Programa de Bacteriología y laboratorio clínico



OBJETIVOS

- Realizar un análisis retrospectivo del sistema CRISPR- Cas haciendo énfasis en su potencial como herramienta para el diagnóstico de enfermedades virales de importancia en salud pública.

OBJETIVO GENERAL

- Trazar una línea de tiempo que indique la trayectoria del sistema CRISPR-Cas en cuanto a su descubrimiento, aplicaciones, resultados de las investigaciones realizadas, ventajas, desventajas y aplicaciones a futuro.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Describir el funcionamiento de las nuevas técnicas de Diagnóstico de enfermedades infecciosas implementadas a partir del sistema CRISPR.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Analizar las aplicaciones de la herramienta CRISPR-Cas12a y Cas13a, las dificultades que pueda presentar y los beneficios para el diagnóstico de enfermedades de tipo viral.

OBJETIVOS ESPECIFICOS



CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

- Objetivos
- Introducción
- Que es edición de genes
- ZFN
- TALEN´S
- Trayectoria del sistema CRISPR-Cas
- Enfermedades virales de importancia en salud publica
- Aplicaciones: CRISPR como herramienta para el diagnostico de enfermedades
- Resultados
- Resultados mas relevantes
- Conclusiones
- Expectativas a futuro



INTRODUCCIÓN

EDICIÓN DE GENES

- NUCLEASAS DE DEDOS DE ZINC
- NUCLEASAS DE TIPO ACTIVADORES DE LA TRANSCRIPCIÓN (TALENs)

CRISPR

- SISTEMA DE INMUNIDAD NATURAL DE LAS BACTERIAS Y CASI TODAS LAS ARQUEAS ANTE LA INVASIÓN POR VIRUS

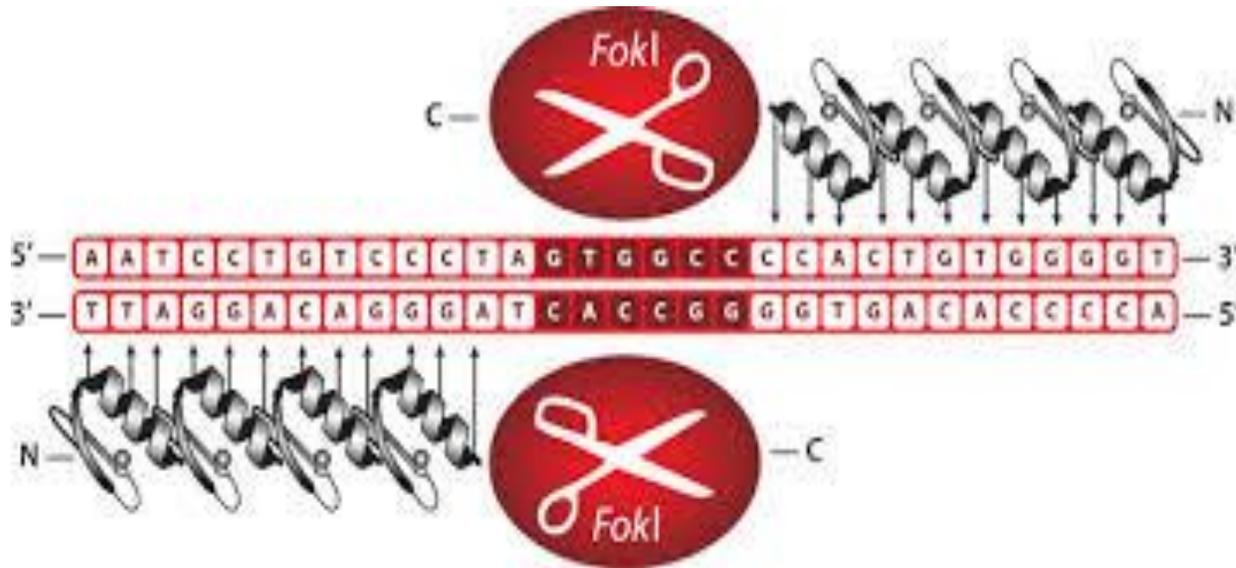
APLICACIONES

- DIAGNOSTICO DE ENFERMEDADES VIRALES

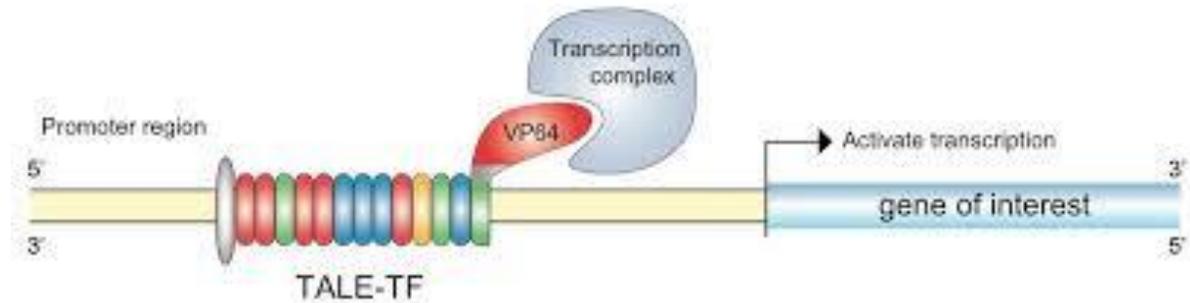


EDICIÓN DE GENES

NUCLEASAS DE DEDOS DE ZINC (ZFN)



NUCLEASAS DE TIPO ACTIVADORES DE LA TRANSCRIPCIÓN (TALEN'S)



EDICIÓN DE GENES

- NUCLEASAS DE DEDOS DE ZINC
- NUCLEASAS DE TIPO ACTIVADORES DE LA TRANSCRIPCIÓN (TALENs)

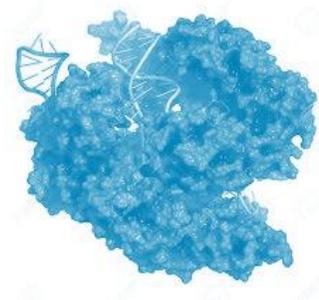
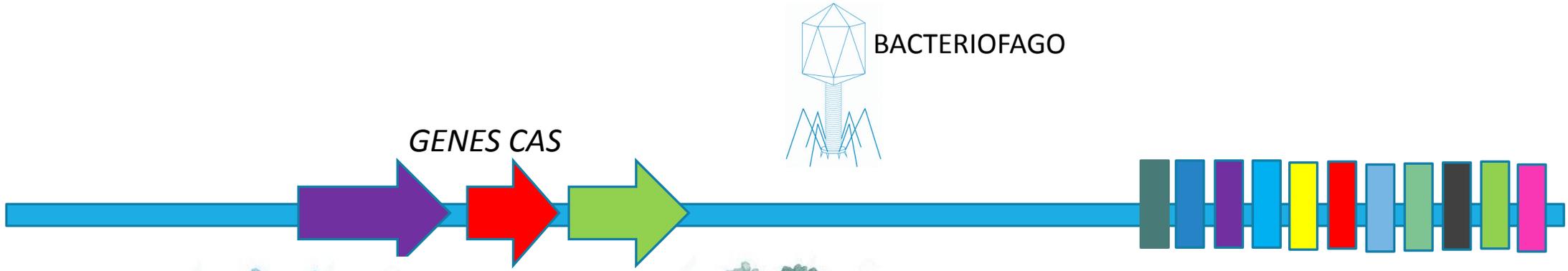
CRISPR

- SISTEMA DE INMUNIDAD NATURAL DE LAS BACTERIAS Y CASI TODAS LAS ARQUEAS ANTE LA INVASIÓN POR VIRUS

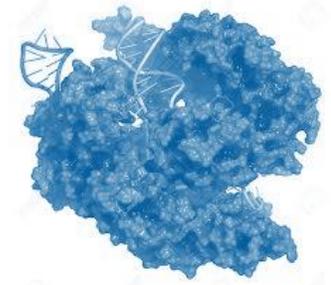
APLICACIONES

- DIAGNOSTICO DE ENFERMEDADES VIRALES

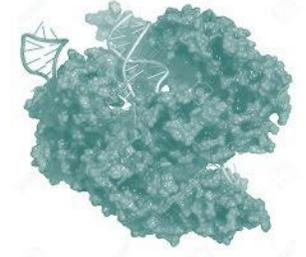




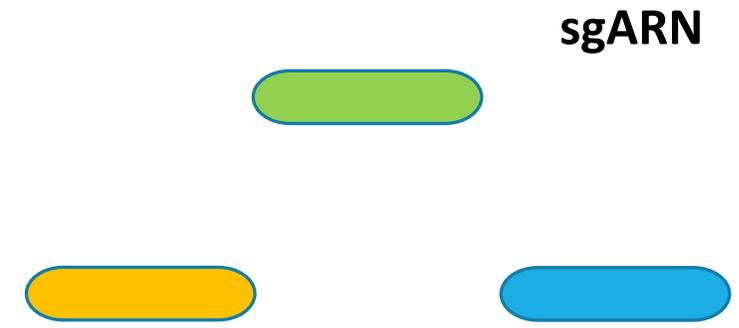
Cas9



Cas12A



Cas13



ANTECEDENTES

Nucleotide Sequence of the *iap* Gene, Responsible for Alkaline Phosphatase Isozyme Conversion in *Escherichia coli*, and Identification of the Gene Product

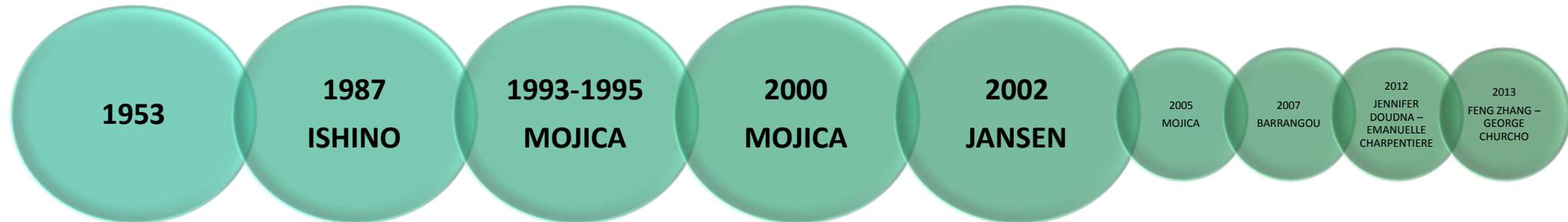
YOSHIZUMI ISHINO, HIDEO SHINAGAWA, KOZO MAKINO, MITSUKO AMEMURA, AND ATSUO NAKATA*
Department of Experimental Chemotherapy, The Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University, 3-1 Yamadaoka, Suita, Osaka 565, Japan

Received 1 May 1987/Accepted 22 August 1987

[Mol Microbiol.](#) 2000 Apr;36(1):244-6.

Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria.

[Mojica FJ](#), [Díez-Villaseñor C](#), [Soria E](#), [Juez G](#).



[Mol Microbiol.](#) 1995 Jul;17(1):85-93.

Long stretches of short tandem repeats are present in the largest replicons of the Archaea *Haloferax mediterranei* and *Haloferax volcanii* and could be involved in replicon partitioning.

[Mojica FJ](#)¹, [Ferrer C](#), [Juez G](#), [Rodríguez-Valera E](#).

[Mol Microbiol.](#) 2002 Mar;43(6):1565-75.

Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes.

[Jansen R](#)¹, [Embden JD](#), [Gaastra W](#), [Schouls LM](#).



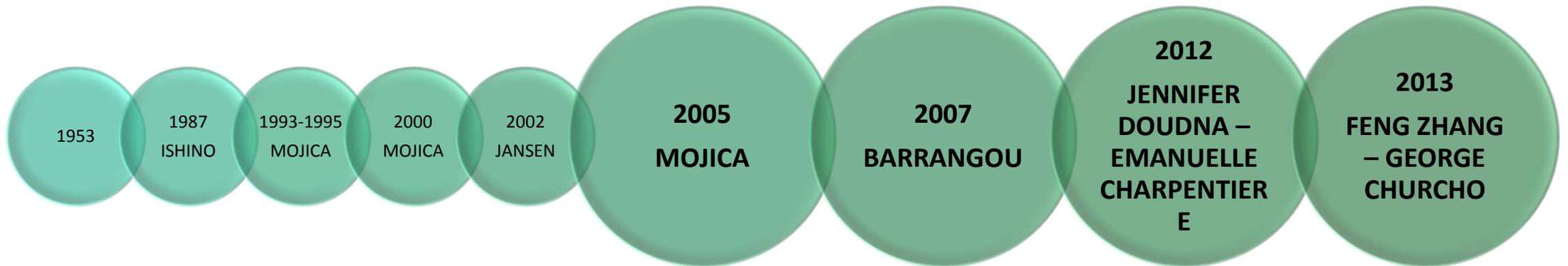
Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems

Le Cong^{1,2,*}, F. Ann Ran^{1,4,*}, David Cox^{1,3}, Shuailiang Lin^{1,5}, Robert Barretto⁶, Naomi Habib¹, Patrick D. Hsu^{1,4}, Xuebing Wu⁷, Wenyan Jiang⁸, Luciano A. Marraffini⁸, and Feng Zhang^{1,†}

J. Mol. Evol. 2005 Feb;60(2):174-82.

Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements.

Mojica F.J¹, Díez-Villaseñor C, García-Martínez J, Soria E.



Science. 2012 Aug 17;337(6096):816-21. doi: 10.1126/science.1225829. Epub 2012 Jun 28.

A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity.

Jinek M¹, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E.

Science. 2007 Mar 23;315(5819):1709-12.

CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes.

Barrangou R¹, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, Romero DA, Horvath P.



APLICACIONES

RESEARCH

BIOTECHNOLOGY

CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity

Janice S. Chen,^{1*} Enbo Ma,^{1*} Lucas B. Harrington,^{1*} Maria Da Costa,² Xinran Tian,³ Joel M. Palefsky,² Jennifer A. Doudna^{1,3,4,5,6†}

REPORT

Field-deployable viral diagnostics using CRISPR-Cas13

Cameron Myhrvold^{1,2,*†}, Catherine A. Freije^{1,2,3,*†}, Jonathan S. Gootenberg^{1,4,5,6,7,‡}, Omar O. Abudayyeh^{1,5,6,7,8,‡}, Hayden C...

+ See all authors and affiliations

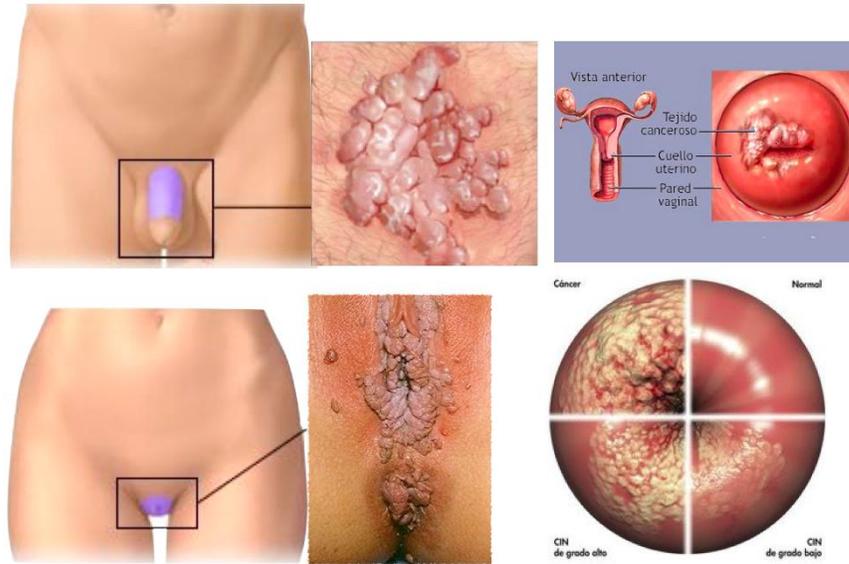
Science 27 Apr 2018:
Vol. 360, Issue 6387, pp. 444-448
DOI: 10.1126/science.aas8836

Multiplexed and portable nucleic acid detection platform with Cas13, Cas12a, and Csm6

[Jonathan S. Gootenberg](#),^{1,2,3,4,7,*} [Omar O. Abudayyeh](#),^{1,2,3,4,5,*} [Max J. Kellner](#),¹ [Julia Joung](#),^{1,2,3,4} [James J. Collins](#),^{1,4,5,6,8} and [Feng Zhang](#)^{1,2,3,4,†}



ENFERMEDADES VIRALES DE IMPORTANCIA EN SALUD PÚBLICA



ENFERMEDAD	QUE ES - SINTOMAS	DIAGNOSTICO
VPH	Enfermedad de transmisión sexual. Generalmente asintomática, puede provocar verrugas genitales o cáncer.	<ul style="list-style-type: none"> • Observación de las verrugas • Solución de ácido acético • Papanicolaou • Prueba de ADN
DENGUE	Infección viral causada por mosquitos del genero Aedes principalmente <i>Aedes aegypti</i> . Inicia con fiebre, cefalea y puede terminar en la muerte si afecta órganos como encéfalo, miocardio, riñón o hígado.	<ul style="list-style-type: none"> • Aislamiento viral • Detección de antígeno viral o anticuerpos del paciente • Detección de ARN viral en suero o tejidos
ZIKA	Infección viral causada por misquitos del genero Aedes principalmente <i>Aedes aegypti</i> . Sus síntomas generalmente son fiebre, erupciones cutáneas, conjuntivitis, dolores musculares y articulares, malestar y cefalea. Complicaciones en embarazadas (microcefalia, malformaciones congénitas)	<ul style="list-style-type: none"> • Detección de ARN viral (RT-PCR) • Amplificación de ácidos nucleicos (NAAT) • Aislamiento viral • Determinación de IgM e IgG
FIEBRE AMARILLA	Los principales síntomas son fiebre, cefalea, náuseas, malestar general, dolor muscular, congestión facial, bradicardia. 15% al 25% de los casos presentar la forma grave de la enfermedad; con insuficiencia hepática y renal, con necrosis hepática, presencia de albuminuria. En los casos fatales pueden presentar miocarditis y encefalitis	<ul style="list-style-type: none"> • Hemograma con plaquetas • Hepatograma GOT, GPT, bilirrubinas • Función renal, creatinina y urea • Aislamiento viral • Determinación de IgG • Detección del antígeno en tejidos por inmunohistoquímica (Post mortem)



TIPO DE ENSAYO	QUE SE ENCUENTRA	TIEMPO DE REALIZACIÓN	SENSIBILIDAD	ESPECIFICIDAD	VENTAJAS	DESVENTAJAS
CULTIVO VIRAL	EL VIRUS	48 HORAS O SEMANAS	BUEN, RELATIVA A LA MUESTRA	EXCELENTE	AMPLIO RANGO DE DETECCIÓN MAYOR SENSIBILIDAD QUE LAS PRUEBAS RAPIDAS INFORMA SOBRE LA INFECTIVIDAD DEL VIRUS DETECTADO (73)	REQUIERE MAYOR TIEMPO , NECESITA CULTIVOS CELULARES, ENTRENAMIENTO DEL PERSONAL O PERSONAL EXPERTO E INFRAESTRUCTURA COSTOSA (73)
INMUNO ENSAYO	FORMACIÓN DE ANTIGENO-ANTICUERPO MEDIANTE RECONOCIMIENTO Y UNION (1)	20 MINUTOS APROX.	100%	99,7% A 100%	ALTA VELOCIDAD Y RENDIMIENTO, METODO AUTOMATIZADO	DEBE CONFIAR EN LA GARANTIA DEL CONTROL DE CALIDAD ALTO RIESGO DE INTERFERENCIAS ALTO COSTO (73)
INMUNO FLUORESCENCIA	ANTIGENOS O ANTICUERPOS	2 A 6 HORAS	70% A 80%	EXCELENTE	RESULTADO RAPIDO	MENOS SENSIBLE QUE EL CULTIVO NECESITA EQUIPO ROBUSTO PERSONAL EXPERTO LIMITADO A TIPO VIRAL PUEDE PRESENTAR FALSOS POSITIVOS POR FACTOR REUMATOIDEO (73)
PCR	ADN-ARN VIRAL	48 horas	>99,5%	98% a 100%	DETECTAVIRUS NO VIABLE DETECTA INFECCIONES MULTIPLES PUEDE INACTIVARSE EL PATOGENO PUEDE DETECTAR NUEVOS PATOGENOS (73)	REQUIERE EQUIPO VIGOROS , PERSONAL ENTRENADO COSTO ELEVADO NO INFORMA LA INFECTIVIDAD NECESITA CONDICIONES ESTRUCTAS DE ASTRINGENCIA. ALTO COSTO (73)
NAAT	AMPLIFICACION Y DETECCIÓN DE SECUENCIAL DEL GENOMA VIRAL (ADN O ARN) (1)	>90 MIN.	90% al 100%	98% al 100%	GENOTIPODO, DETERMINACION DE LA CARGA VIRAL, NUEVOS FORMATOS COMPACTOS Y PORTATILES (73)	TIEMPO DE EJECUCIÓN MAS LARGO REQUIERE CEBADORES ESPECIFICOS PARA LOS OBJETIVOS (73)
NGS	POLIMERIZACION DE LA PLANTILLA DE ADN MEDIANTE LA INCORPORACION DE dNTP ETIQUETADOS Y FINALIZAR LA EXTENSION (1)	VARIABLE	EXCELENTE	EXCELENTE	IDENTIFICACIÓN DE NUEVAS SECUENCIAS GENOMICAS, GENOTIPADO, DETECCIÓN PRECISA DE MUTACIONES Y MUTACIONES RESISTENTES A FARMACOS (73)	ALTO COSTO , NECESITA HABILIDADES BIOINFORMATIXCAS PARA EL ANALISIS DE DATOS RETRASO EN EL USO PARA DIAGNOSTICOS CLINICOS DE RUTINA (73)



EDICIÓN DE GENES

- NUCLEASAS DE DEDOS DE ZINC
- NUCLEASAS DE TIPO ACTIVADORES DE LA TRANSCRIPCIÓN (TALENs)

CRISPR

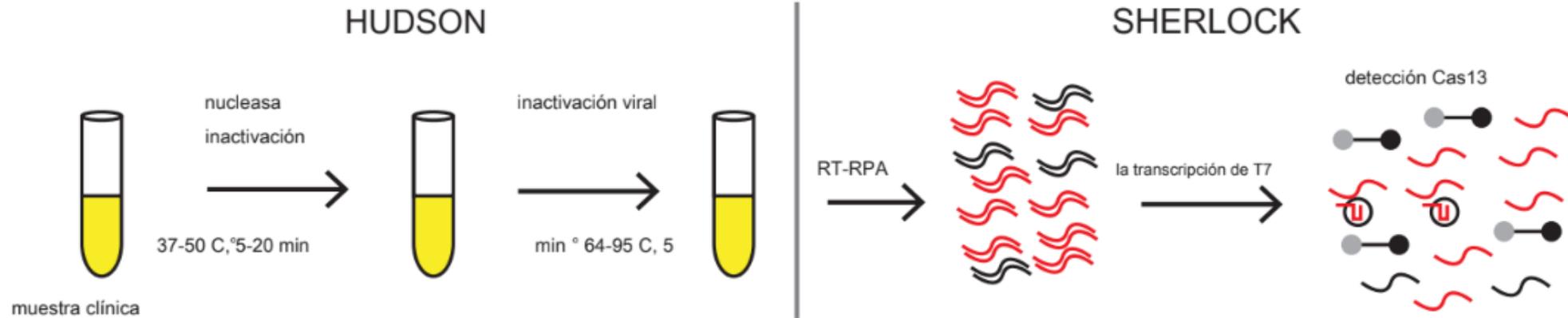
- SISTEMA DE INMUNIDAD NATURAL DE LAS BACTERIAS Y CASI TODAS LAS ARQUEAS ANTE LA INVASIÓN POR VIRUS

APLICACIONES

- DIAGNOSTICO DE ENFERMEDADES VIRALES



SHERLOCK (Desbloqueo específico de reportadores enzimáticos de alta sensibilidad)



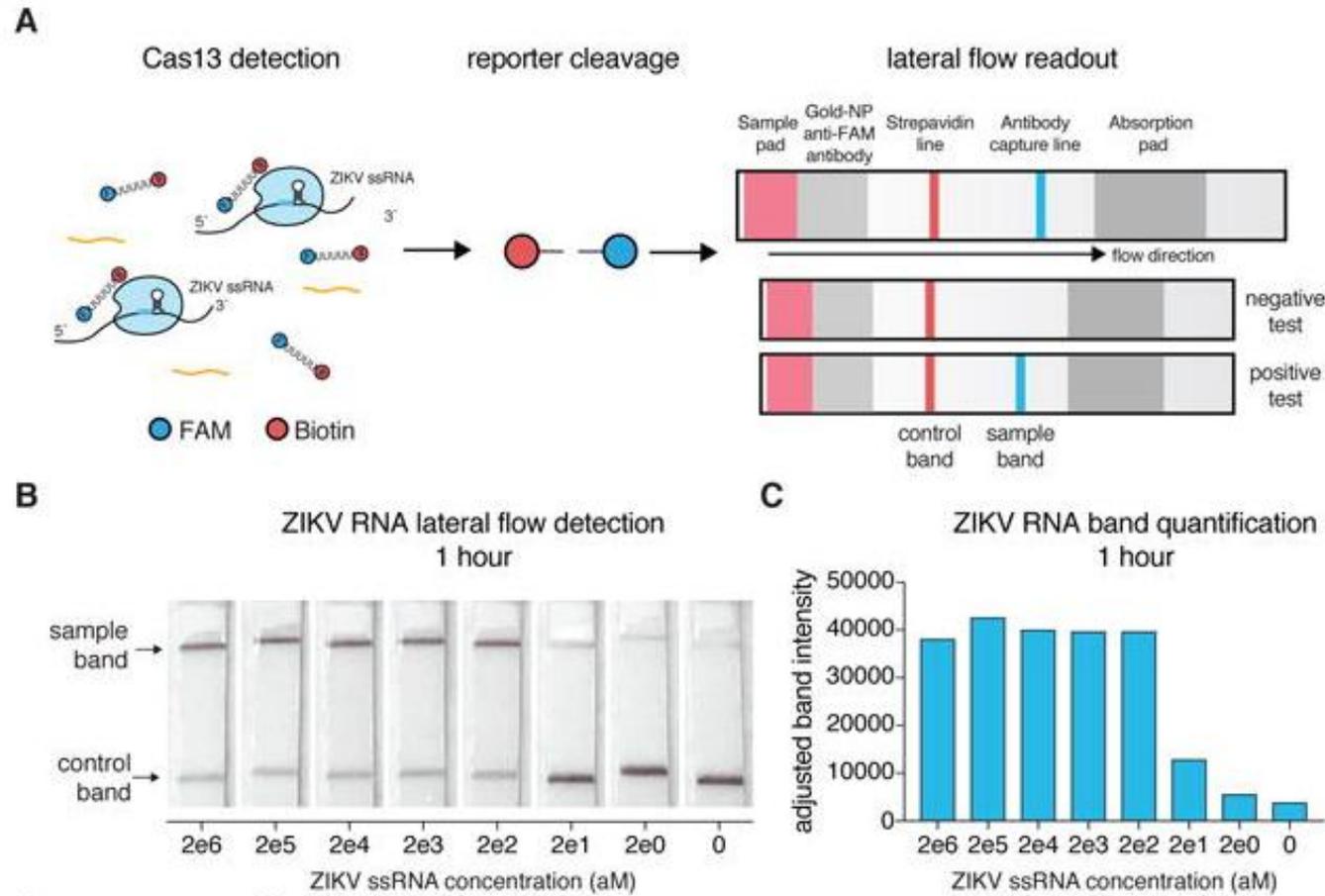


Figura 11: Adaptación de SHERLOCK para detección de flujo lateral. A) Esquema de detección de flujo lateral con SHERLOCK. B) Detección de ARNss de ZIKV sintético utilizando SHERLOCK de flujo lateral con 1 hora de reacción LwaCas13a. C) Cuantificación de la intensidad de la banda a partir de la detección en (B)

Tomado de: Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Kellner MJ, Joung J, Collins JJ, Zhang F. Multiplexed and portable nucleic acid detection platform with Cas13, Cas12a, and Csm6. *Science* (80-) [Internet]. 2018 Apr 27 [cited 2019 Apr 27];360(6387):439–44. Available from: <http://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.aaq017> (70).



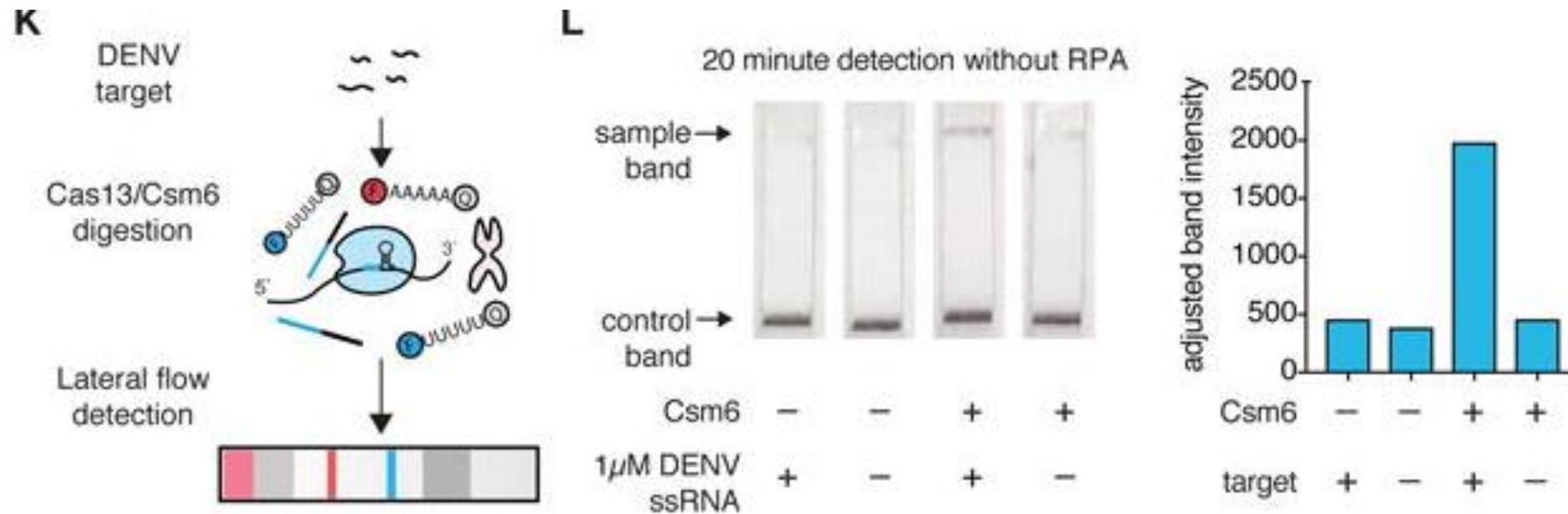
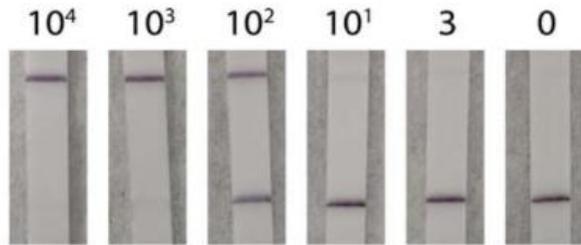


Figura 10: Adaptación de SHERLOCK para detección de flujo lateral. K) Esquema de lectura de flujo lateral de detección de LwaCas13a mejorada con EiCsm6 de ssRNA de DENV. L) Detección de flujo lateral mejorada de EiCsm6 de ARN de DENV sintético en combinación con LwaCas13a sin preamplificación por RPA. Cuantificación de la intensidad de la banda.

Tomada de: Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Kellner MJ, Joung J, Collins JJ, Zhang F. Multiplexed and portable nucleic acid detection platform with Cas13, Cas12a, and Csm6. *Science* (80-) [Internet]. 2018 Apr 27 [cited 2019 Apr 27];360(6387):439–44. Available from: <http://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.aag017> (70).



ZIKV cp/μl (PBS dilutions)



ZIKV cp/μl (urine dilutions)

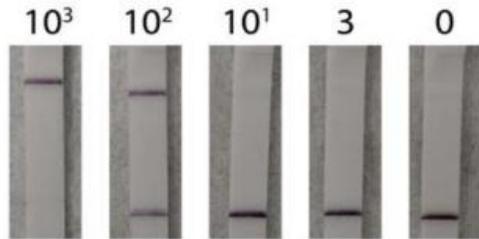
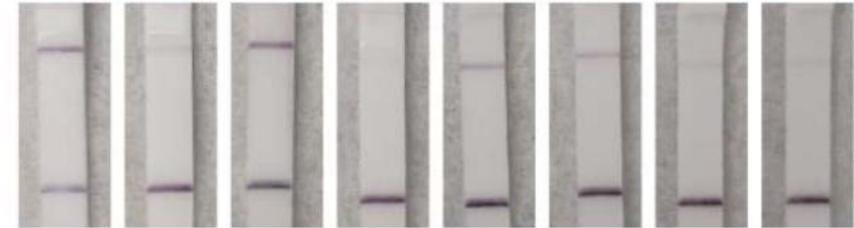


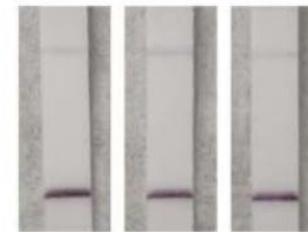
Figura 12 Detección del virus de ZIKA dilución en orina, lectura en tiras de flujo lateral. La banda superior es la prueba y la banda inferior es el control. Una banda débil es visible en 10 copias por microlitro tanto en diluciones por PBS como en orina, una hora post detección.

Tomada de: Myhrvold C, Freije CA, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Metsky HC, Durbin AF, et al. Field-deployable viral diagnostics using CRISPR-Cas13. *Science* (80-) [Internet]. 2018 Apr 27 [cited 2019 Apr 27];360(6387):444–8. Available from: <http://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.aas8836> (69)

Patient serum



Patient saliva



Healthy Serum



Healthy Saliva



No Input



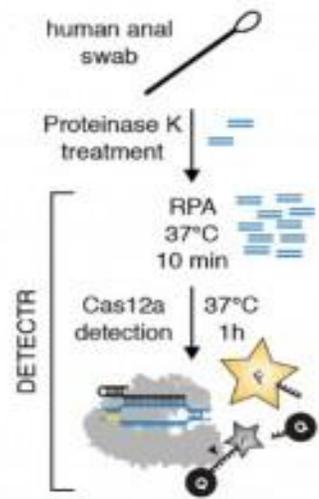
Figura 13: Detección en tiras de flujo lateral de DENV a partir de muestras tratadas con tris(2-carboxietil) clorhidrato de fosfina (TCEP)- EDTA antes de ser calentadas.

Tomada de: Myhrvold C, Freije CA, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Metsky HC, Durbin AF, et al. Field-deployable viral diagnostics using CRISPR-Cas13. *Science* (80-) [Internet]. 2018 Apr 27 [cited 2019 Apr 27];360(6387):444–8. Available from: <http://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.aas8836> (69)



DETECTR (Reportero CRISPR dirigido a endonucleasas de ADN)

Doudna Lab



J. S. Chen et al., Science
10.1126/science.aar6245 (2018)

DETECTR



METODOLOGIA

TIPO DE INVESTIGACIÓN

- Documental, estudio descriptivo
- Revisión de artículos, monografías, reportes de entidades de salud

REVISIÓN DE ARTÍCULOS

- Artículos de revistas como Science, Genética Médica, Dciencia, Scielo, Science Daily, Reportes de la OMS, Guías de la secretaría de salud en Colombia, Artículos de universidades como Universidad Politécnica de Valencia, Universidad de la Coruña, Universidad de Cantabria, Proyectos como World mosquito program.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- Artículos que incluyan los métodos usados anteriormente para edición génica, basados en las herramientas Dedos de Zinc y TALENs
- Artículos científicos del sistema CRISPR-cas desde 1987 hasta la fecha.
- Artículos científicos de enfermedades virales de importancia en salud pública en Colombia como Dengue, Fiebre Amarilla, Zika, VPH y los problemas con el diagnóstico de estas.



RESULTADOS

Idioma de publicación de los documentos consultados

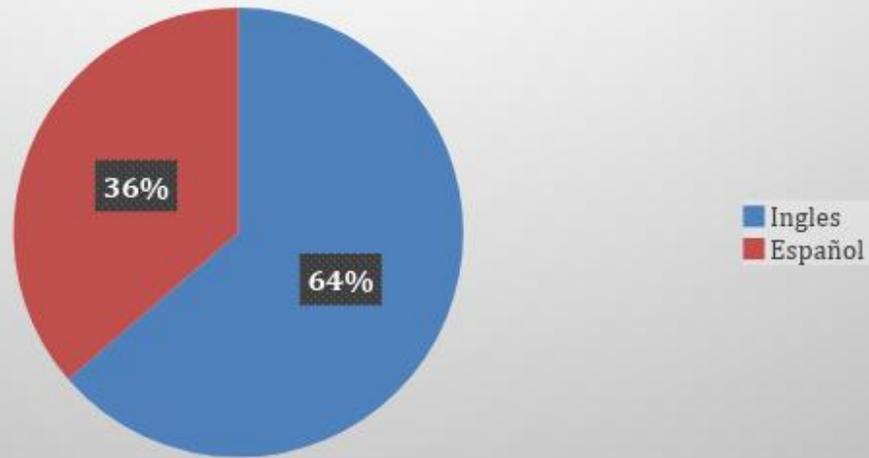


Figura 14. Idioma de publicación de los documentos consultados

Bases de datos consultadas

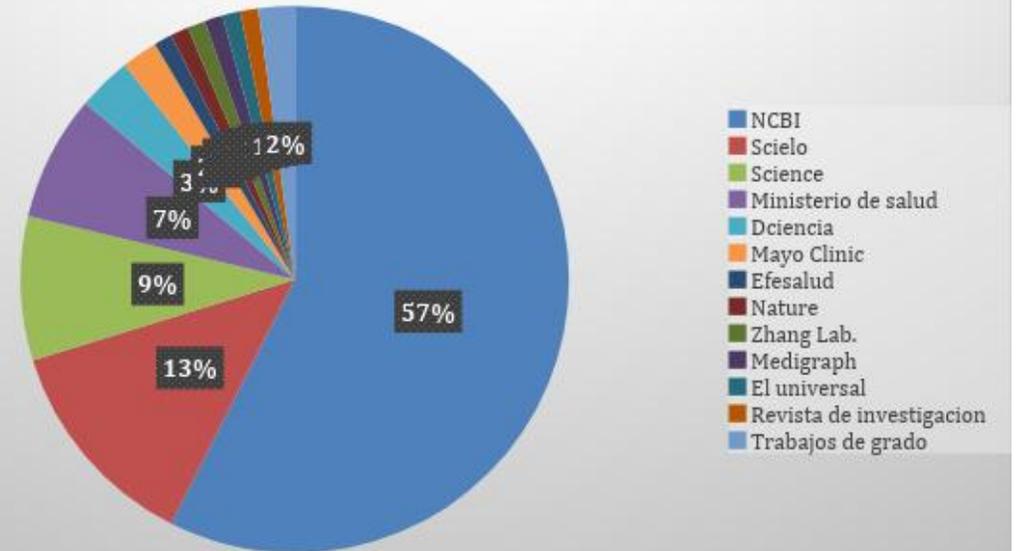


Figura 15 Bases de datos consultadas



Eje central de investigación

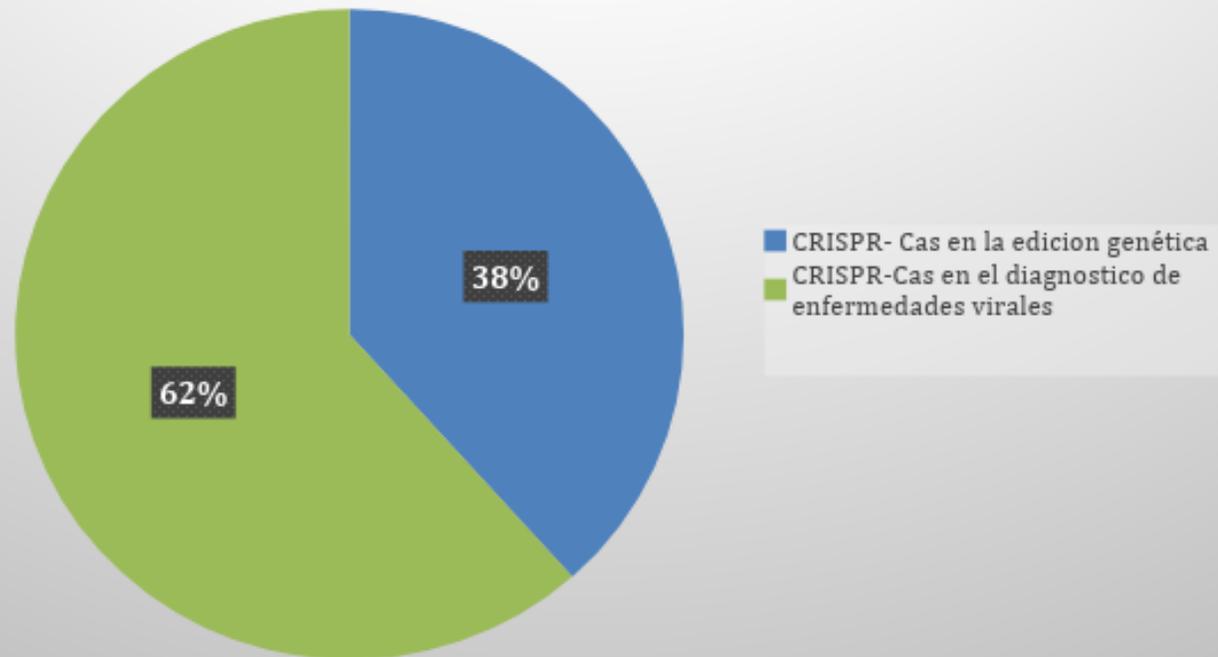


Figura 16 eje central de investigación



RESULTADOS MAS RELEVANTES

Cas12a

Cas13 son endonucleasas con preferencia de corte de ADN y ARN respectivamente. Permiten el diagnostico de enfermedades virales (SHERLOCK y DETECTR)

Las técnicas de amplificación isotérmica a una temperatura constante y baja reemplaza la PCR y permite una herramienta de dx portátil que se puede implementar en lugares donde no cuentan con equipos especializados.

Cas12a puede escindir en un ssADN mediante la tecnología DETECTR que acoplado a la amplificación isotérmica con un sgRNA marcado con la proteína Cas12a ha permitido la detección de dos genotipos distintos de VPH en muestras de pacientes.

Hudson es un método que permite lisar partículas virales e inactivar las ribonucleasas presentes en fluidos por medio de calor y reacciones químicas

SHERLOCK es una herramienta que usa Cas13 para la detección de ARN y combinado con HUDSON es posible la detección de ácidos nucleicos específicos directamente de muestras de pacientes (saliva, orina, sangre total, suero)

Al tomar muestras de sangre y agregarles TCEP/EDTA con el fin de inactivar Rnasas de ZIKV, DENV, se expusieron al método HUDSON y posteriormente el protocolo SHERLOCK marcando Cas13 con una molécula de FAM-RNA.biotina, se pudo evidenciar la presencia del virus en tiras de flujo lateral.



Se comparo el rendimiento de SHERLOCK con la prueba de amplificación de ácidos nucleicos ALTONA Realstar se demuestra que SHERLOCK proporciona un 100% de sensibilidad, 100% de especificidad y 100% de concordancia

Al Combinar Csm6 con la detección de Cas13 en tiras de flujo lateral de demuestra una disminución en el tiempo de lectura de 1hora a 20 minutos

SHERLOCK se puede programar para la detección de paneles multivirus, permitiendo la detección de especies virales y serotipos

Las pruebas usadas actualmente para el diagnostico de enfermedades virales proporcionan porcentajes de sensibilidad y especificidad de un 70% a un 100%, presentan desventajas como costos, maquinaria, son dependientes de casas comerciales

CRISPR permite el diagnostico de enfermedades virales en laboratorios de I, II, III y IV nivel, llegando a lugares remotos. Esto facilita un diagnostico oportuno en corto tiempo, agiliza los proceso en salud, disminuye costos.

CONCLUSIONES

Los sistemas CRISPR-Cas han proporcionado herramientas revolucionarias para la edición del genoma. El descubrimiento de las proteínas asociadas al sistema (Cas) con diversas actividades ha permitido herramientas sensibles para la detección de ácidos nucleicos. Recientemente se aprovechan estas nuevas tecnologías con potencial para desarrollar herramientas de diagnóstico prácticas y de bajo costo para la detección de diversos virus.

Las proteínas Cas tienen una preferencia de corte específica para ARN como lo es para Cas13 y para ADN con Cas12. Investigadores como Feng Zhang y Jennifer Doudna proponen sistemas como SHERLOCK y DETECTR que facilitan la detección de ácidos nucleicos, adaptaron el sistema de manera que incluyeron moléculas de ARN unidas a fluorocromos que al ser cortadas son capaces de emitir luz.

Es posible la detección de material genético viral o elementos de degradación de los mismos en muestras de sangre, Orina, Saliva, suero. Los resultados finales de la detección pueden ser evidenciados en tiras de flujo lateral, de manera fácil, rápida y confiable.

El sistema puede potencializarse conjugando la proteína Cas13 con Csm6 para la detección de ZIKV y DENV, esto reduce el tiempo de respuesta de 1 hora a 20 minutos por medio de la prueba SHERLOCKv2 en tiras de flujo lateral.

Gran utilidad para el área del laboratorio clínico y en especial para la Bacteriología, porque teniendo en cuenta que las pruebas CRISPR demuestran 100% de sensibilidad, 100% de especificidad y 100% de concordancia con respecto a otras pruebas con las que se evaluó la efectividad del sistema, los profesionales en el área tendrían la disponibilidad para realizar mayor número de pruebas con resultados confiables.



GRACIAS