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



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

Guion docente

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

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

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

1. ¿Qué palabras te parecen clave para entender qué tienes que hacer? Márcalas en el texto.

Por ejemplo: cansado, fiebre, bulto bajo el brazo, biopsia, ganglios linfáticos, linfoma, tumor, CRISPR.

2. ¿Hay algún concepto que no entiendas del todo? ¿Qué crees qué es?

Por ejemplo: biopsia (extracción de células que forman parte del tumor), ganglios linfáticos (órgano del sistema inmunitario donde maduran los linfocitos), linfoma (cáncer que se origina en los ganglios linfáticos, a partir de los linfocitos que están madurando en este órgano), CRISPR (herramienta de terapia génica que nos permite modificar el ADN).

No hay que saberlo, es solo para ver el nivel de la clase y para que empiecen a pensar sobre los conceptos que aparecerán más adelante.

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

2. Objetivos

Los objetivos de esta práctica son los siguientes:

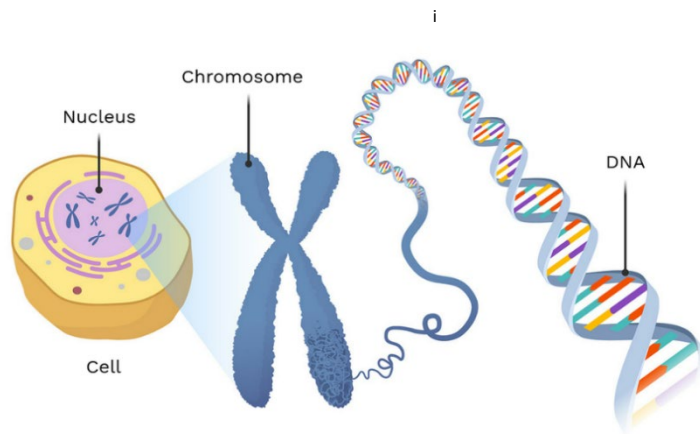
- a) Familiarizarse con el linfoma y otros tipos de tumores.
- b) Entender cómo funciona el ADN y las translocaciones, principal mutación de los linfomas.
- c) Aprender el funcionamiento de la edición génica para CRISPR-Cas9.
- d) Conocer algunas herramientas bioinformáticas.
- e) Aprender a realizar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



3. El linfoma y las translocaciones

Esta explicación se hace con la presentación, incluyendo actividades dinámicas para comprobar que se esté entendiendo todo bueno (aprox. 30 min. de exposición).

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



Fuente: Django-wiki

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

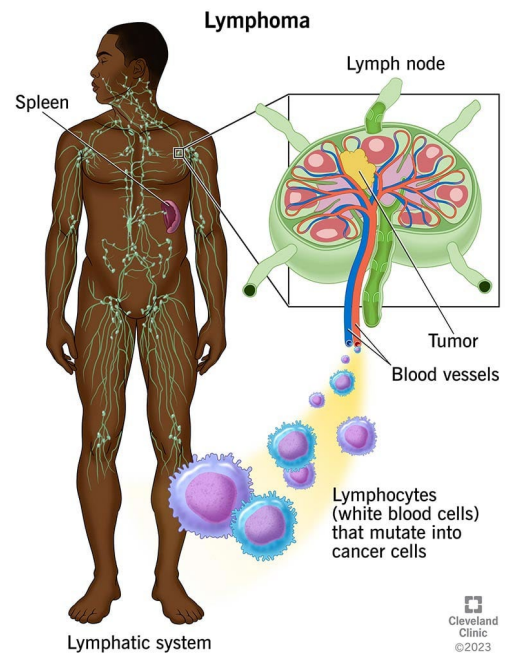
Cuando las células se dividen, el ADN se duplica, de forma que cada una de las copias pase a cada célula hija. Pero este proceso de duplicación del ADN da lugar a errores, también denominados mutaciones. Estos errores son muy abundantes, y la mayoría son corregidos o eliminados por nuestro propio cuerpo.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

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

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

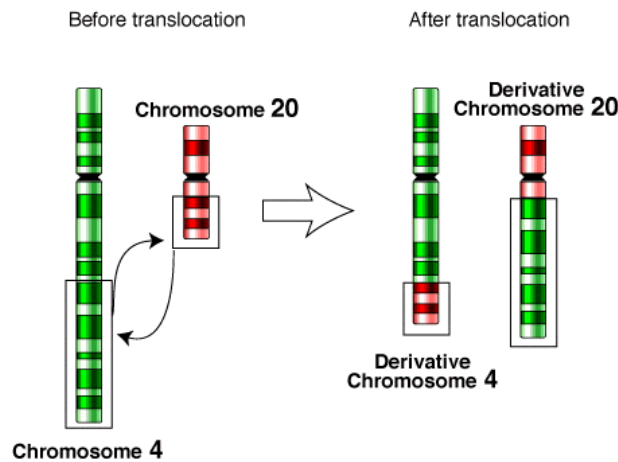
- **Benignos:** las células siguen manteniendo su identidad celular, y no se diseminarán.
- **Malignos:** las células han mutado tanto que han perdido la identidad celular. También los conocemos como **cáncer**, y tienen la capacidad de diseminarse en otros tejidos, originando metástasis.

Dependiendo de cuáles son las células a partir de las que se origina el tumor, podemos encontrar diferentes tipos de cánceres. En el caso del linfoma, es un tipo de cáncer que se origina en los ganglios linfáticos a partir de los linfocitos, que son células del sistema inmunitario. Hay dos tipos de linfocitos, B y T, pero los dos tienen una función en común: detectar a agentes externos a nuestro organismo e iniciar una respuesta inmunitaria contra este.



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

originar combinaciones únicas. Pero este proceso puede comportar muchas mutaciones deficitarias por los linfocitos, que hace que no sobrevivan. En algunos casos, sin embargo, los linfocitos pueden contener mutaciones que los hacen crecer más que el resto de células y, en lugar de morir, crecen descontroladamente generando linfoma. La gran mayoría de linfomas están caracterizados para contener translocaciones en sus linfocitos, que son uno de los causantes del desarrollo del tumor.



Fuente: Wikimedia Commons

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

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

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

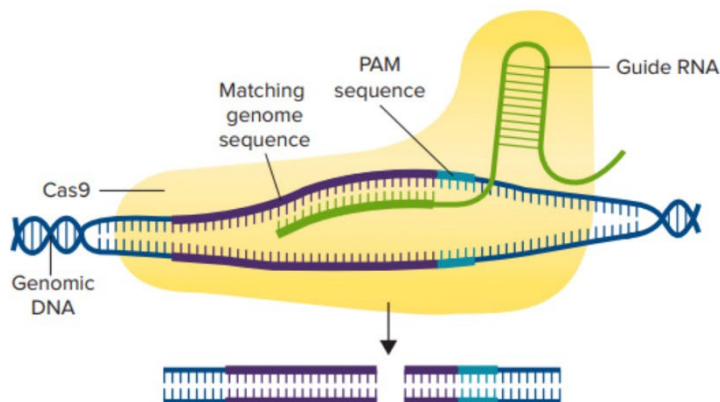
Terapia génica: CRISPR-Cas9

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

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

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

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



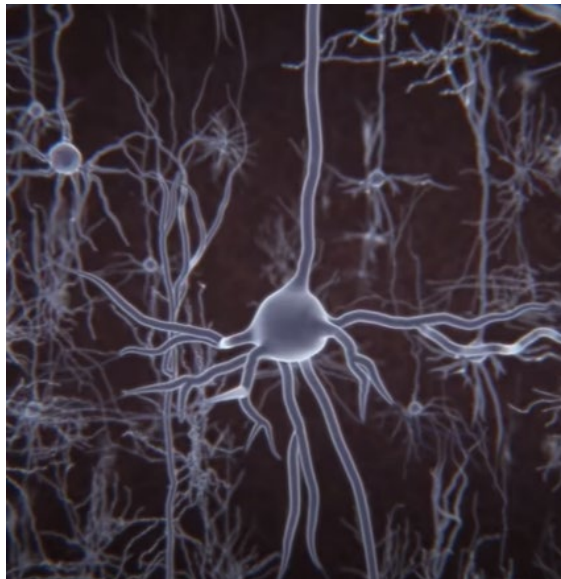
Fuente: <https://www.moleculardevices.com/applications/gene-editing-with-crispr-engineering>

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

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

A veces, pero, el ARN guía puede unirse en otras regiones del ADN que no es la que habíamos escogido. Esto se denominan “off-target effects”, y podrían tener consecuencias desastrosas para el organismo. Por lo tanto, todavía no es un sistema del todo seguro, y por eso no se utiliza como tratamiento.

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



4. Hipótesis y predicciones

Nuestro paciente tiene linfoma de células del manto, que contiene la translocación t(11;14) y sobreexpresa el gen de la Ciclina D1 (CCND1). Ninguno de los tratamientos habituales ha funcionado. Sabiendo esto, y ahora que ya entendemos cómo funciona la terapia génica, ¿cómo podríamos utilizarla como tratamiento?

Es importante que los estudiantes piensen qué terapia se podría aplicar y por qué, para demostrar que han entendido la teoría y que pueden imaginarse como aplicarlo (aprox. 15 min.).

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

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

Se podría eliminar el gen de la CCND1, que es el que está sobreexpresado. Este tratamiento no es real ni efectivo, pero sirve para plantearse.

También sería correcto si dicen que se podría revertir la translocación, aunque es mucho más difícil de hacer con CRISPR.

2 - ¿Qué elementos necesitaríamos?

Necesitaríamos ARN guía que detecte el gen CCND1, Cas9 para formar el complejo ARN-Cas9, células del paciente en las que probar que funcione.

3 - ¿Qué problemas creéis que podríamos tener?

Muchos: efectos off-target, es decir, que atacemos a otros genes. Que atacemos a todas las células, no sólo a las cancerígenas, y que por lo tanto generemos muchos efectos secundarios al paciente. Y sobre todo, que no podemos hacer CRISPR en todas las células del paciente. Debería hacerse en células madre y hacer un trasplante de estas células, lo que conlleva aún más dificultades.

5. Diseño del experimento

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

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

Se puede hacer plantear a los estudiantes qué pasos harían antes de leerlos. Es más estimulante para ellos, pero quizás demasiado difícil si no han oído hablar nunca de estos conceptos (aprox. 15 min.).

¿Qué resultados esperas obtener y por qué?

Esperamos ver que algunas de las muestras de ADN son más pequeñas, lo que significa que hemos eliminado correctamente el gen de la CCND1.

6. Protocolo bioinformático

Cada estudiante necesita un ordenador para trabajar. La actividad se puede realizar en grupos si no hay ordenadores para todos. Está bien empezar la parte práctica (bioinformática) el primer día de la actividad, porque la parte de laboratorio es más larga.

La parte práctica consiste en buscar el gen CCND1 en UCSC y generar los ARN guía utilizando CHOPCHOP. Permite hacer más visible lo que haremos en el laboratorio. Las preguntas posteriores sirven para ampliar el temario a gusto y nivel de la clase. Por ejemplo, se puede explicar las partes de los cromosomas, cómo se mide el ADN, etc. Tiempo aprox.: 30 min.

1. Observación del gen CCND1

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

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

¿En qué cromosoma está localizado el gen CCND1?

En el cromosoma 11.

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

13,319 pares de bases

¿Qué coordenadas tiene la CCND1?

Chr11: 69,641,156 – 69,654,474

2. Generación de los ARN guía

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

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

Secuencia ARN guía	Eficiencia	Localización	Secuencia PAM
<i>GTGTTCAATGAAATCGTGCGGGG</i>	<i>71.43</i>	<i>chr11:69643884</i>	<i>GGG</i>
<i>TGTTCTCGCAGACCTACGGAGG</i>	<i>68.74</i>	<i>chr11:69643022</i>	<i>AGG</i>
<i>GGTTGGCATCGGGGTACGCGCGG</i>	<i>61.43</i>	<i>chr11:69641355</i>	<i>CGG</i>
<i>GCGACGATCTCCGCATGGACGG</i>	<i>56.71</i>	<i>chr11:69641473</i>	<i>CGG</i>
<i>ATCGGGGTACGCGCGGCGGATGG</i>	<i>42.07</i>	<i>chr11:69641348</i>	<i>TGG</i>

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

7. Protocolo experimental

Si da tiempo el día anterior, es mejor echar un vistazo al protocolo antes de ir al laboratorio. La práctica es larga, así que si el segundo día ya está preparado mejor. La clase se divide en 4 grupos (o más si son muchos, máximo 6 grupos, dependiendo del kit). Explicación de la parte práctica: aprox. 10 min.

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

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

Puntos a tener en cuenta cuando trabajamos en el laboratorio

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

Material Las pipetas, puntas y aparatos de electroforesis son proporcionados por la FCRI. El resto (probetas, matraces, cubetas y microondas), debe estar en la escuela.

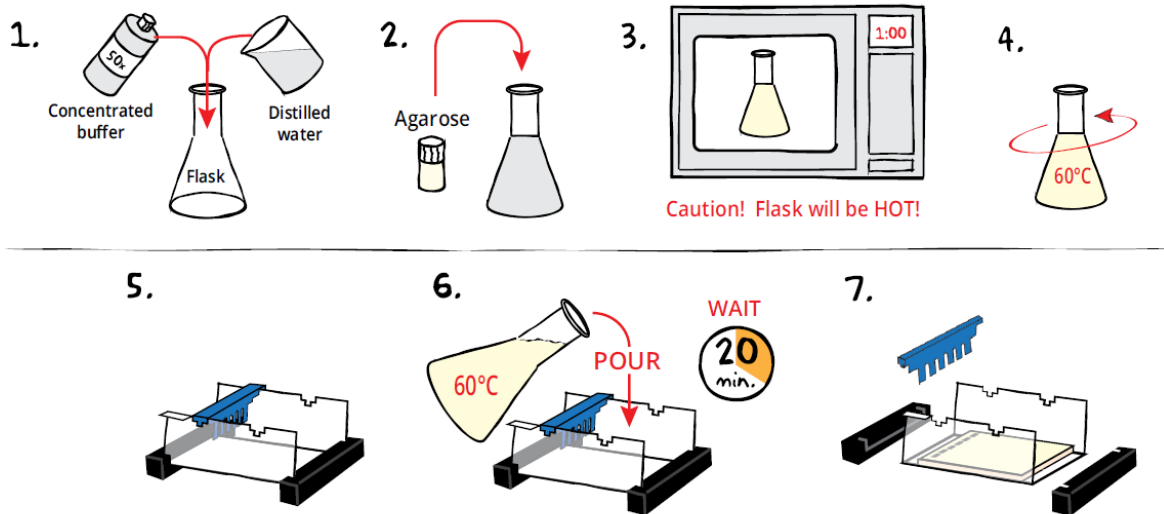


Fuente: Lab Comercial, Lab Comercial, Hawach Scientific, AP Medical, Quirumed, Auxilab

Reactivos Todos los reactivos vienen con el kit, excepto el agua destilada, que hay que llevarla a la escuela.

- Agua destilada
- Tampón de electroforesis 50x
- Agarosa
- Muestras de ADN
- Marcador de pes molecular
- Tint FlashBlue 10x

Procedimiento I. Preparación del gel de agarosa Aprox. 10 min. para la explicación y para realizar los cálculos. La práctica durará aprox. 20 min. Después hay un tiempo de incubación de 20-30 minutos, durante los cuales iremos explicando la siguiente práctica.



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

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

Cálculos

$$150 \text{ ml} \cdot \frac{1x}{50x} = 3 \text{ ml tampón} \rightarrow 150 \text{ ml} - 3 \text{ ml} = 147 \text{ ml agua}$$

Mezcla la agarosa en polvo con el tampón de electroforesis 1x en un matraz de 250 ml. Ten en cuenta que la agarosa debe tener una concentración final del 0,8%, y el gel tiene un volumen final de 45 ml.

Cálculos

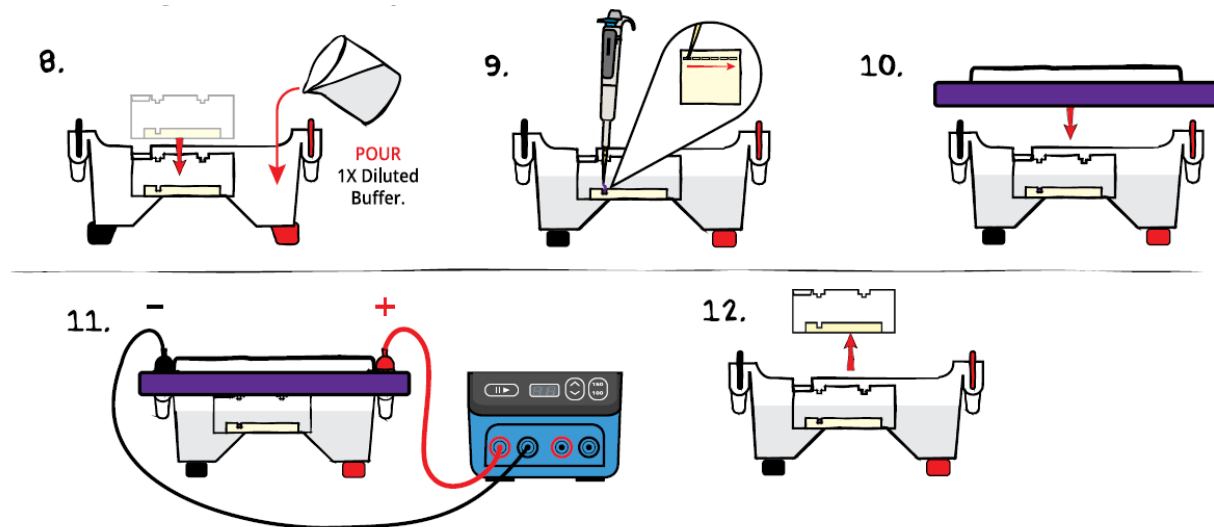
$$0,8\% \cdot 45 \text{ ml} = 0,36 \text{ g agarosa} \rightarrow \text{enrasar con tampón 1x hasta los 45 ml.}$$

1. Para disolver la agarosa, beba la solución poniéndola en el microondas durante 1 minuto. Con cuidado, saca el matraz y revolver. Si no se ha disuelto del todo, continúa calentando la solución durante 15 segundos y repite el proceso hasta que se disuelva toda la agarosa. La solución debería ser transparente como el agua.
2. Enfría la agarosa hasta los 60°C aproximadamente mientras vamos removiendo el matraz.
3. Mientras la agarosa se enfría, monta la cubeta con los plásticos negros de los extremos bien presionados, y el cepillo encima, tal y como se ve en el dibujo.

4. Vierte la solución de agarosa a la cubeta y déjala enfriar por completo. La solución tardará unos 20 minutos en solidificar.

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

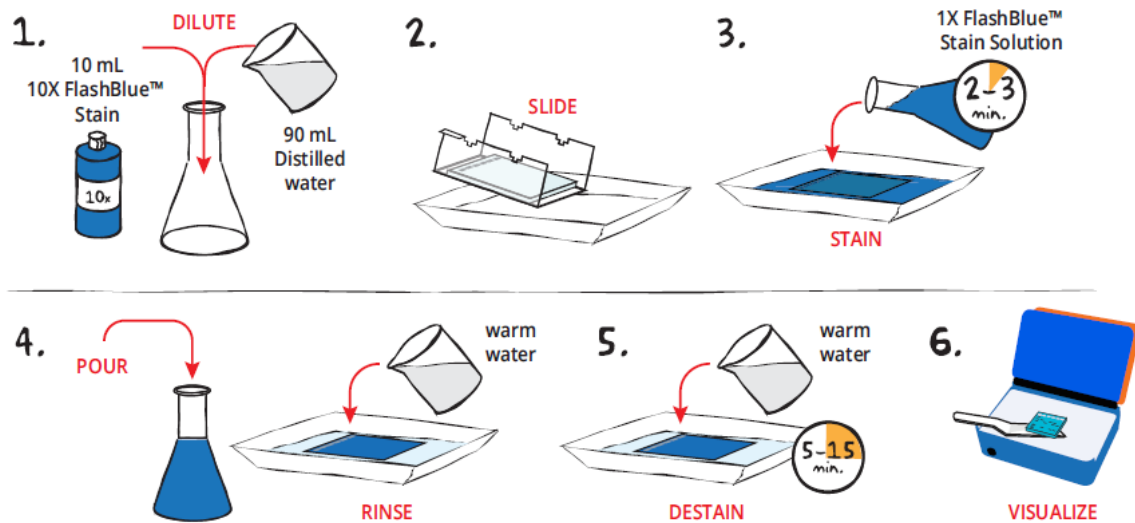
Procedimiento II. Electroforesis de las muestras de ADN Durante el punto 6 de la parte anterior, explicamos la parte práctica y aprendemos a utilizar la pipeta. Lo preparamos todo para ir más rápido una vez que el gel sea sólido (aprox. 15 min. de montaje, y 10-25 min. de espera).



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

1. Una vez que el gel ha solidificado, extraemos los plásticos negros y el cepillo de la cubeta. Mantenemos el gel sobre la cámara que lo aguanta para que no se nos rompa.
2. Ponemos el gel en la cámara (aún con el plástico de soporte), y lo cubrimos con tampón de electroforesis 1x hasta que quede todo cubierto.
3. Pipeteamos las muestras individualmente dentro de cada pozo. No hay que sacar la tapa de las muestras, se puede pinchar directamente con la punta de la pipeta. ¡Recuerda cambiar la punta cada vez que cambias de muestra!
4. Pon la tapa de la cubeta y comprueba que la orientación es correcta. El polo negativo (negro) debe quedar en la zona donde has puesto las muestras, ya que estas correrán desde el polo negativo hasta el polo positivo (rojo).
5. Conecta los cables a cada electrodo de la cubeta, también vigilando que los colores sean los adecuados. Inicia la corriente eléctrica entre 100 y 150 voltios (dependiendo del tiempo que tengamos). Veremos que funciona correctamente si vemos burbujas en el tampón, que nos indican que hay corriente eléctrica. ¡Vigila siempre donde están las muestras, que no corran demasiado y salgan del gel!
6. Una vez que la electroforesis se ha completado (más o menos cuando el marcador se encuentra a más de 3 cm del inicio), podemos apagar la corriente eléctrica y extraer el gel de la cámara.
7. Mientras las muestras corren (entre 10 y 40 minutos), prepararemos los siguientes pasos y hacemos los cálculos.

Procedimiento III. Tinción del gel y visualización de las muestras *Mientras las muestras corren por el gel, realizamos los cálculos y preparamos el tampón FlashBlue 1x. Preparamos las cubetas, el agua caliente y todo el material. La práctica durará aprox. unos 30 min.*



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

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

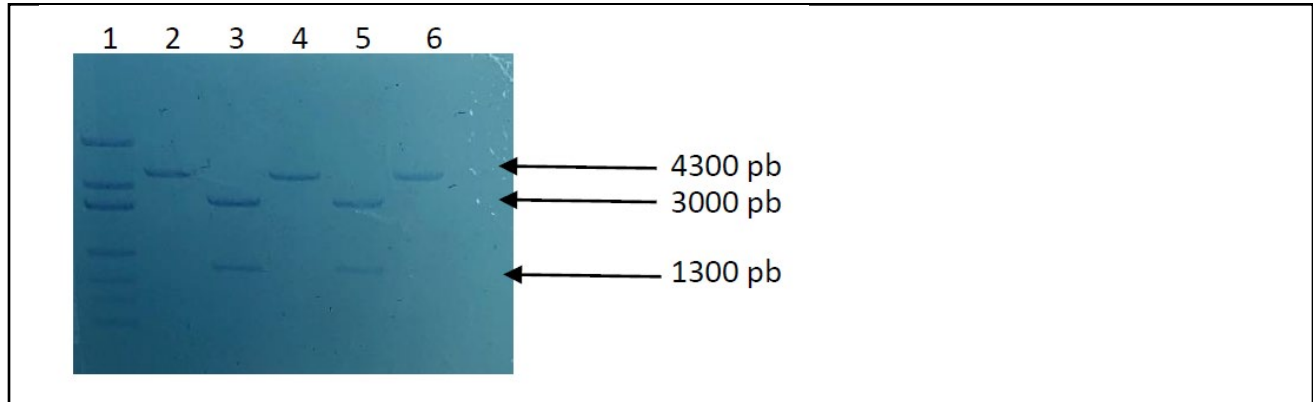
Cálculos

$$100 \text{ ml} \cdot \frac{1x}{10x} = 10 \text{ ml FlashBlue} \rightarrow 100 \text{ ml totales} - 10 \text{ ml FB} = 90 \text{ ml agua}$$

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

8. Interpretación de los resultados

Dibuja o copia una fotografía de los resultados que hemos obtenido. *Esta parte se puede realizar al final de la práctica si da tiempo u otro día en la escuela.*



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

En la columna 1 tenemos el marcador, que nos indica el peso molecular de las muestras.

Los ARN guía 1, 3 y 5 (columnas 2, 4 y 6), no han funcionado, ya que el ADN tiene el peso original (4300 pb). En cambio, los ARN guía 2 y 4 (columnas 3 y 5), sí han cortado el gen de la CCND1. Podemos verlo porque el fragmento es más pequeño (3000 pb), y el fragmento del gen que hemos cortado se puede ver más abajo (1300 pb).

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

Sería un tratamiento efectivo para reducir los niveles de CCND1. Sin embargo, hay diferentes problemas:

Reducimos la CCND1 en todas las células, de manera que no podrán dividirse, ni las células tumorales ni las sanas.

No podemos aplicar el tratamiento a todas las células del paciente. Deberíamos hacerlo en células madre y hacer un trasplante.

La CCND1 no es el único gen afectado. En un cáncer, hay muchos genes y muchas vías afectadas, y si arreglamos la CCND1, quizás otra vía empeora. Es como una fuga de agua: cuando tapas un agujero, el agua sale por otro lado.

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

¿Qué ventajas creéis que tiene la terapia génica?

Podemos ver cómo funcionan los genes, porque si los cortamos, vemos qué vías se alteran. Podemos modificar organismos, evitar enfermedades en embriones, estudiar el desarrollo de las especies, arreglar mutaciones...

¿Inconvenientes?

Hay dos inconvenientes principales, pero pueden pensar muchos más:

- Hay off-target effects que no sabemos cómo funcionan muy bien, ni cómo evitarlo. El hecho de haber probado siempre la técnica en cultivo y no in vivo en personas hace que no sepamos qué efecto total podría tener. Además, es difícil poder estudiar el efecto general, porque puede afectar en muchas vías diferentes.*
- Problemas éticos: ¿hasta dónde podríamos modificar un organismo? ¿Sería ético escoger qué genes queremos y cambiarlos en los embriones? ¿Podríamos seleccionar lo que nos interese más? ¿Podríamos cambiarnos los genes para hacernos más fuertes, más inteligentes o más artísticos?*

Escribe la conclusión de vuestro grupo y otras ideas interesantes.

Para incentivar el debate, aquí tenemos diferentes propuestas para el profesorado:

- Miniserie de "Antinatural selection". Está en Netflix, pero se basa en conspiraciones y la visión negativa de CRISPR.*
- Documental "Human Nature" (<https://montoliu.naukas.com/2020/05/30/human-nature/>), en Netflix también, es un poco más realista que el anterior y habla de la parte más positiva de la edición génica.*
- Aquí hay una noticia de debates que se realizan en el PRBB para hablar de temas de ciencia y ética: <https://ellipse.prbb.org/es/aspectos-eticos-de-crispr-un-debate-necesario/>*
- Explicación de CRISPR de manera dinámica por la Youtuber Hiperactina: https://www.youtube.com/watch?v=UaxrYWCyLdY&ab_channel=LaHiperactina*
- Herramienta para plantear debates: https://wordgen.serpmedia.org/assets/developing_discussions.pdf.*