



CRISPR: ¿Cómo gestionamos la revolución del futuro?



Fuente: James Steinberg

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





1.1. Hace apenas dos años que salisteis de la carrera, y os encontráis trabajando en una empresa biotecnológica en Cataluña llamada GACT Biotech. Un buen día, os llegan noticías de que la junta directiva ha decidido empezar un nuevo proyecto basado en la modificación de embriones mediante una técnica nueva y revolucionaria llamada CRISPR/Cas9. Esta tecnología parece tener el potencial de, por primera vez en la historia de la biología, permitirnos modificar el genoma humano con relativa facilidad, fiabilidad, y de manera económica. Responde a las siguientes preguntas:

,
llamada CRISPR/Cas9. Esta tecnología parece tener el potencial de, por primera ve en la historia de la biología, permitirnos modificar el genoma humano con relativo facilidad, fiabilidad, y de manera económica. Responde a las siguientes preguntas:
1. ¿Cómo funciona la técnica de CRISPR/Cas9?
2. ¿Qué ventajas e inconvenientes tiene esta técnica?
3. Esta técnica se ha llevado a cabo en humanos?





- 1.2. Por el que escucháis en la oficina, parece claro que el objetivo de la empresa es ofrecer un servicio que permita la modificación genética de embriones con CRISPR/ Cas9, tanto para evitar enfermedades genéticas hereditarias como para escoger ciertas características físicas o cognitivas a deseo de los padres (lo que se conoce como "niños a la carta"). Cuando los rumores se confirman, unos cuantos decidís reuniros y reflexionar seriamente sobre las implicaciones éticas de esta aplicación biotecnológica. Algunos ponen sobre la mesa la posibilidad de abandonar la empresa, mientras otros parecen bastante decididos a seguir en el nuevo proyecto...
- Leed la carta que os darán y reflexionad sobre las preguntas. Podéis apuntar vuestras ideas o argumentos en el recuadro de la página siguiente. Tenéis 10 minutos para llevar a cabo esta tarea.
- Una vez hayáis acabado, los que tengáis la misma ficha reuníos en grupos y poned en común, durante 10 minutos, vuestros puntos de vista. Apuntad las ideas o argumentos que vayáis tratando y consensuando en el recuadro de la página siguiente.
- Escoged un representante para que haga una introducción al resto de grupos sobre el caso que habéis tratado y la discusión grupal que habéis mantenido, mencionando brevemente los puntos de vista y posiciones éticas que han surgido durante la puesta en común.
- Cuando todos los grupos hayan acabado, jempezará el debate a nivel clase!

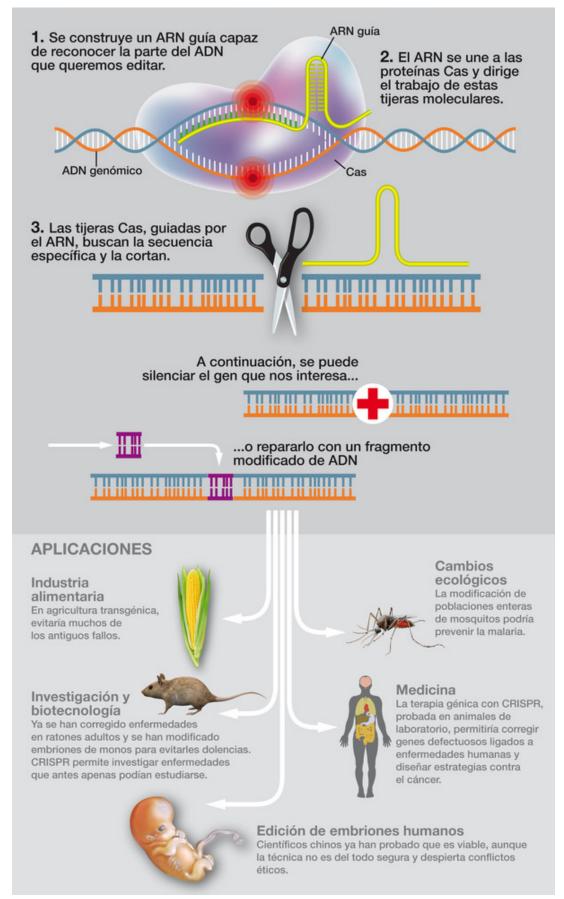




Espacio para las ideas o argumentos de la primera reflexión individual:	
 Espacio para las ideas o argumentos de la reflexión grupal: 	







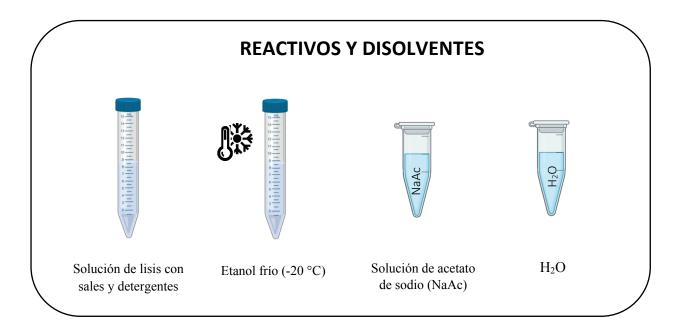
Fuente: Así funciona CRISPR, la herramienta de edición del ADN. José Antonio Peña/Agencia SINC





2.1. A pesar de vuestras reservas éticas, decidís continuar en la empresa. Al cabo de unos meses, llegan a vuestro laboratorio muestras de tejido procedentes de los primeros pacientes sometidos a terapia génica. Ahora, vuestro trabajo consiste en identificar las muestras y comprobar si el gen de interés ha sido modificado con éxito o si, por el contrario, hemos provocado mutaciones no deseadas. Empezamos con la extracción de ADN de las muestras. Tenéis todos los reactivos y material necesarios para llevar a cabo vuestra tarea. El apartado "Ayuda" os facilitará el diseño de vuestro protocolo. ¡A trabajar!









Ayuda: Tenéis que tener en cuenta que una muestra de ADN en solución acuosa precipita si agregamos cationes y alcohol. Primero, los cationes neutralizan las cargas negativas del ADN. Después, el alcohol provoca una disminución en la solubilidad del ADN que, presencia de altas concentraciones de sales, precipita.

Orden	Paso del protocolo	Justificación





Protocolo experimental

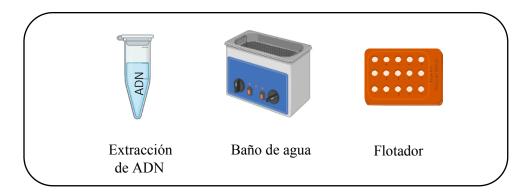
- 1. Añadir 1ml de "Solución de lisis" al pellet de células y resuspender con la pipeta.
- 2. Incubar 10 min a temperatura ambiente.
- 3. Añadir a la muestra una décima parte de su volumen (V/10) de solución de acetato de sodio (NaAc) y agitar por inversión.

Cálculos:		

4. Precipitación con etanol frío. Añadir 3 veces el volumen inicial (Vi · 3) de etanol frío. Mezclar lentamente por inversión.



- 5. Pescar el ADN y resuspender con la pipeta en 1 ml de H₂O.
- 6. Debido a que la molécula de ADN obtenida es muy larga, es necesario incubar a 55 °C durante 10 min. para una completa resuspensión en el H₂O (puesto que la temperatura aumenta la solubilidad). Utiliza el siguiente material:







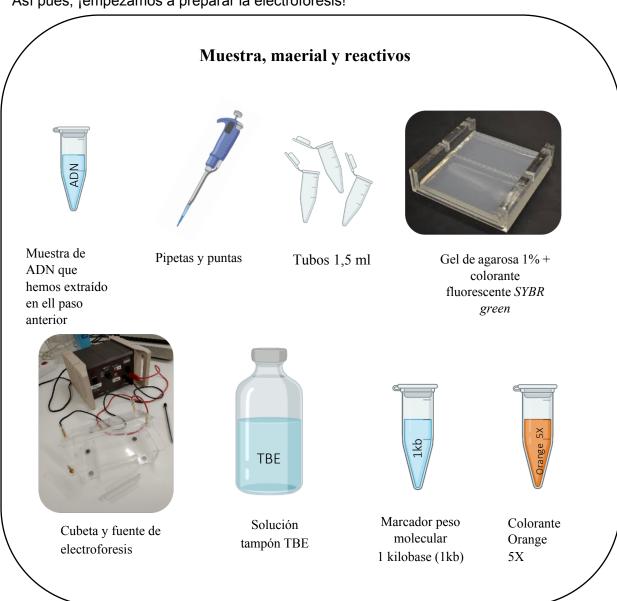
Preguntas y conclusiones

•	Al final de la práctica, ¿qué has observado? ¿Qué es lo que ha causado el resultado final?
•	¿Qué tendría que pasar si hubieras llevado a cabo el último paso de la precipitación con agua fría en vez de etanol?
•	Si no hubieras hecho el primer paso de lisis, ¿qué crees que habría pasado?
•	¿Crees que este protocolo funcionaría con un cabello? ¿Y con una célula vegetal?
•	Existe un protocolo de extracción de ADN parecido que utiliza agua con sal, jabór lavavajillas y etanol. Relaciona estos componentes con los que has utilizado er esta práctica.
•	En el precipitado final, ¿obtenemos solo ADN?





2.2. Una vez tenemos todo el ADN extraído, el siguiente paso para comprobar si la terapia ha funcionado es amplificar el gen de interés. Esta amplificación —es decir, tener muchas copias únicamente del gen que nos interesa— se hace mediante la técnica de PCR (Polimerase Chain Reaction). El producto resultante de la PCR, que contiene millones de estas copias, se somete a una electroforesis para confirmar que se ha amplificado el fragmento deseado. Sabremos si la PCR ha salido bien por la medida molecular del fragmento amplificado, es decir, su "peso". En nuestro caso, como no tenemos el material para hacer una PCR, realizaremos la electroforesis con el ADN genómico que hemos extraído, y de esta forma confirmaremos que todo ha ido bien durante la extracción. Finalmente, este producto de PCR se enviará a secuenciar. Así pues, ¡empezamos a preparar la electroforesis!

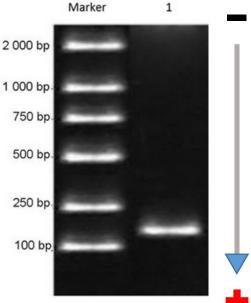






Ayuda: La electroforesis en gel es una técnica utilizada para separar fragmentos de ADN (u otras macromoléculas, como ARN y proteínas) por su peso molecular y carga eléctrica. La electroforesis consiste en aplicar una corriente eléctrica a través de un gel que contiene las moléculas de interés. Debido a que todas las moléculas de ADN tienen la misma cantidad de carga por masa (es decir, dos cadenas de ADN de la misma longitud –pero secuencia diferente– tendrán siempre la misma carga), la electroforesis en gel separa los fragmentos de ADN únicamente por su medida. Por lo tanto, la electroforesis nos permite ver qué grandes son los fragmentos de una muestra. Además, si a uno de los pozos del gel añadimos una "escala" estándar de fragmentos de medida conocida (lo que se denomina un marcador de peso molecular), podemos determinar la medida absoluta de los fragmentos de ADN de nuestra muestra.

A continuación, os mostramos un ejemplo de revelado de un gel de electroforesis de una muestra de ADN amplificada utilizando PCR. En la columna de la izquierda, es decir, en el primer pozo, vemos cómo ha corrido el marcador de peso molecular ("Marker"). Los números indican la medida de cada uno de los fragmentos del marcador (2.000 pares de bases, 1.000 pares de bases, ...). Fijaos que los fragmentos más pesados han "viajado" menos. En la columna de la derecha podemos ver cómo ha corrido la muestra... ¿sabríais decir, aproximadamente, qué longitud tiene el fragmento amplificado?







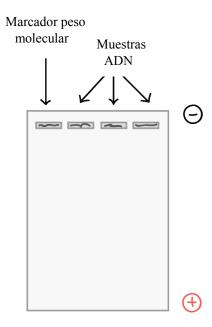
Protocolo experimental

- 1. Añadir en un tubo de 1.5 ml:
 - X cantidad de muestra (extracción de ADN)
 - X cantidad de colorante Orange G 5x (tener en cuenta que la concentración final tiene que ser 1x)

Para tener un volumen final de 30 µl.



- 2. Preparación de la cubeta de electroforesis: montaje del gel de agarosa e incorporación de la solución tampón TBE (se realizará en común con el grupo clase).
- 3. Cargar al primer carril del gel 3 µl del marcador de peso molecular de 1 kb (este paso solo lo llevará a cabo uno de los grupos).
- 4. Cargar en el gel 20 μl de la disolución anterior (muestra + Orange G) en el carril del gel que corresponda a cada grupo.



- 5. Programar la fuente de electroforesis a 100 voltios durante 20 minutos.
- 6. Visualización del gel de electroforesis mediante una lámpara de luz ultravioleta (UV).





Una vez los fragmentos de ADN se han separado, podemos examinar el gel y, cogiendo como referencia el marcador de peso molecular, saber el peso de las muestras que hemos cargado. En nuestro caso, el gel de agarosa está preparado con un compuesto fluorescente llamado SYBR Green que se asocia a las moléculas de ADN. Así, podemos visualizar las bandas de ADN con una lámpara de luz ultravioleta. En nuestro caso, como no disponemos de una lámpara de luz UV, el docente se llevará el gel para visualizarlo en el laboratorio y hacer una fotografía de los resultados que llevará a la siguiente sesión. Una vez comprobada el éxito de la extracción de ADN, jes hora de enviar a secuenciar las muestras!





3.1. Por fin han llegado los resultados de la secuenciación de las extracciones de ADN genómico que enviasteis el otro día. Los archivos que os han llegado están en formato FASTA. Este formato se utiliza para representar secuencias de nucleótidos y de aminoácidos; veréis que el símbolo ">" se utiliza para indicar el nombre del gen o proteína. Cada grupo recibiréis tres secuencias, correspondientes a:

- 1. La secuencia completa de la proteína wild-type, es decir, la que encontramos más distribuida en la población.
- 2. El resultado de la secuenciación del gen de interés antes de la terapia CRISPR.
- 3. Esta misma secuencia pero después de la terapia.

Vuestro jefe os ha pasado una plantilla con tres preguntas, gritándoos desde el despacho "Quiero los resultados por ayer!". Tendréis que trabajar con las secuencias (alinear las secuencias de nucleótidos, traducirlas a proteína, interpretar los resultados...) para contestarlas. Os iría muy bien utilizar dos recursos web muy sencillos que utilizan rutinariamente los biólogos moleculares. Uno es el software de alineamiento de secuencias (podéis alinear tanto nucleótidos como proteínas, para ver si dos secuencias su idénticas) que encontraréis en la página web de MUSCLE, y el otro el de traducción de nucleótidos a proteínas que encontraréisen ExPASy (con esta herramienta podéis traducir a proteína la pauta de lectura de una secuencia de nucleótidos). Las tres preguntas que tenéis que contestar son las siguientes:

• ¿Ha habido alguna modificación de la secuencia de nucleótidos del gen después de la terapia? En caso de que haya habido una modificación, ¿ha conseguido producir la proteína deseada, es decir, la wild-type?

 Por lo tanto, ¿ha funcionado la técnica de CRISPR? Justifica la respuesta, especificando, en caso de que no haya funcionado, qué ha pasado y cuál tendría que haber sido el resultado esperado.





- 3.2. Una vez acabados los análisis, entregáis los resultados al director, un poco preocupados por las consecuencias legales y las repercusiones éticas que se puedan derivar de ello. El día siguiente, vuestro jefe parece estar "desaparecido en combate", y no se habla de nada más a la oficina... La bomba no tarda mucho a explotar. Pasada una semana, alguien de la empresa filtra a la prensa el fracaso de la mayoría de las intervenciones. ¡Qué revuelo! Un compañero os comenta que esto se veía a venir y, cuando lo miráis desconcertados, os pasa una noticia reciente.
- Leed la noticia, reflexionad, y realizad un pequeño debate en torno a sus implicaciones éticas.