

## Sesión 1

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 noticias 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:

**1. ¿Cómo funciona la técnica de CRISPR/Cas9?**

La técnica de edición genética CRISPR/Cas9 aprovecha las proteínas que participan en el sistema inmunitario que utilizan ciertas bacterias para protegerse contra los virus. Se trata de una inmunidad adquirida, o adaptativa, que integra y «recuerda» las secuencias de ADN de los virus de infecciones anteriores y corta su ADN en caso de una reinfección.

Es precisamente esta combinación de reconocimiento y corte la que utiliza la técnica CRISPR/CAS9. En la variante más simple, se inyecta ARN en la célula que codifica una proteína llamada CAS9 y una secuencia de reconocimiento. La maquinaria de la célula traduce el ARN para sintetizar la proteína CAS9, la cual se pone a trabajar junto con el ARN de reconocimiento añadido: CAS9 talla el ADN de doble cadena exactamente donde el fragmento de ARN de reconocimiento asociado le indica que lo haga. Dado que es posible sintetizar artificialmente cualquier secuencia de ARN, dicha estrategia permite cortar teóricamente cualquier genoma en cualquier lugar.

**2. ¿Qué ventajas e inconvenientes tiene esta técnica?**

**Ventajas:** Es una herramienta económica y fácil de manipular que se ha utilizado con éxito en muchas especies (ratón, rata, pez cebra, primates, plantas ...), abriendo la posibilidad de editar el genoma de prácticamente cualquier especie. Otra de las ventajas del sistema, es que permite editar varias regiones del genoma al mismo tiempo, simplemente utilizando varios ARN de reconocimiento que dirijan a la CAS9 nucleasa a diferentes lugares del genoma.

**Inconvenientes:** A pesar de que es una herramienta muy precisa, también puede producir mutaciones no deseadas, es decir, a lugares del genoma diferentes de los que se corresponderían con el ARN de reconocimiento. Eso pasa cuando este ARN

se une inespecíficamente en un lugar del genoma y la enzima de corte CAS9 actúa. Estos errores son extraordinariamente difíciles de identificar a posteriori.

**3. ¿Esta técnica se ha llevado a cabo en humanos?**

- En el 2018 se inició el primer ensayo clínico in vivo de un fármaco llamado EDIT-101, diseñado para curar la amaurosi congénita de Leber tipo 10, un tipo de ceguera hereditaria. Los pacientes reciben una inyección con la secuencia “corregida” del gen que causa esta enfermedad, y CRISPR se encarga de reemplazar el gen directamente en el organismo. Para más información, véase <https://www.nature.com/articles/d41587-018-00003-2>.
- Investigadores de la Universidad de Pensilvania iniciaron las pruebas de un tratamiento con el objetivo de modificar los linfocitos T, un tipo de célula clave en el sistema inmunológico humano. A los pacientes se les extraen linfocitos T y, en el laboratorio, se modifican para que puedan identificar células cancerígenas (p.ej. de sarcoma o de mieloma múltiple) y atacarlas. Después, se devuelven las células T a los pacientes y se espera a que actúen. Funciona como una inmunoterapia –el tratamiento para el cáncer que estimula las defensas naturales del cuerpo–, pero con el apoyo de CRISPR.

**4. ¿Qué dilemas científicos se pueden derivar del uso de esta tecnología?**

- La técnica tiene el potencial de modificar embriones humanos para que no sufran ciertas enfermedades hereditarias. Pero, ¿cómo definimos los límites del concepto defecto genético? Esto podría derivar en lo que conocemos por “niños a la carta”.
- Se tiene que tener en cuenta el equilibrio entre los beneficios esperados y los riesgos que logremos al recurrir a la técnica, como la mutación no deseada de otros lugares del genoma.
- Los ecosistemas se pueden ver amenazados por la liberación no controlada de seres vivos modificados genéticamente, como mosquitos o plantas. Tampoco está del todo claro cuál es el riesgo de que el material genético modificado salte a otras especies.
- Por otro lado, es complicado encontrar el equilibrio entre una cautela justificada y el bien que se puede hacer con la ayuda de la tecnología CRISPR/CAS9. Hay mucha gente dispuesta a asumir los riesgos de una técnica no del todo controlada, si esto les abre la posibilidad de curarse...

## Sesión 2

### Protocol experimental – Extracción de ADN

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:

Si tenemos 1 ml de volumen inicial,  $1 \text{ ml} = 1000 \mu\text{l}$   $1000 \mu\text{l}/10 = 100 \mu\text{l}$  que se tienen que añadir de NaAc

4. Precipitación con etanol frío. Añadir 3 veces el volumen inicial ( $V_i \cdot 3$ ) de etanol frío. Mezclar lentamente por inversión.

Cálculos:

Si tenemos 1,1 ml de volumen inicial,  $1,1 \text{ ml} = 1100 \mu\text{l}$   $1100 \mu\text{l} \times 3 = 3300 \mu\text{l}$  que se tiene que añadir de EtOH frío

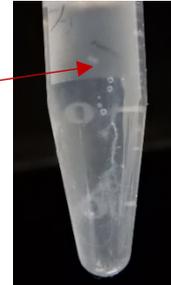
5. Pescar el ADN y resuspender con la pipeta en 1 ml de H<sub>2</sub>O.
6. Debido a que la molécula de ADN obtenida es muy larga, es necesario incubar 55 °C durante 10 min para una completa resuspensión en el H<sub>2</sub>O (ya que la temperatura aumenta la solubilidad). Usa el siguiente material:

## Preguntas y conclusiones

- Al final de la práctica, ¿qué has observado? ¿qué es lo que ha causado el resultado final?

Se ha formado un precipitado (como una medusa blanca) de moléculas de ADN.

Esto ha pasado porque una muestra de ADN en solución acuosa precipita si agregamos cationes (solución acetato de sodio) y alcohol (etanol frío). Primero, los cationes neutralizan las cargas negativas del ADN. Después, el alcohol provoca una disminución en la solubilidad del ADN que, ante presencia de altas concentraciones de sales, precipita.



- ¿Qué tendría que pasar si hubieras llevado a cabo el último paso de la precipitación con agua fría en vez de etanol?

Que el ADN no habría precipitado puesto que no habríamos conseguido disminuir la solubilidad.

- Si no hubieras hecho el primer paso de lisis, ¿qué crees que habría pasado?

La lisis es importante para romper las membranas celulares y extraer el ADN del núcleo. Sin el primer paso de lisis, no conseguiríamos extraer ni precipitar el ADN.

- ¿Crees que este protocolo funcionaría con un cabello? ¿Y con una célula vegetal?

Si el cabello lo hemos cortado, no contiene ADN. Para poder extraer ADN el cabello tiene que tener el folículo piloso adjunto, o la raíz. Aun así, se necesitaría un protocolo más sensible que el que hemos llevado a cabo nosotros. Nuestro protocolo, en cambio, sí que funcionaría para extraer el ADN de células vegetales como por ejemplo las de una fresa, o las de un plátano.

- Existe un protocolo de extracción de ADN pareciendo que utiliza agua con sal, jabón lavavajillas y etanol. Relaciona estos componentes con los que has utilizado en esta práctica.

Altas concentraciones de sal común (NaCl) generan un medio hipertónico que provoca el estallido de células y núcleos, liberando las fibras de cromatina. El detergente o jabón también ayuda a romper las membranas celulares y formar un complejo con las proteínas que empaquetan el material genético, separándolas del ADN. Estos dos componentes harían la misma función que el tampón de lisis y la solución de NaAc.

- En el precipitado final, ¿obtenemos solo ADN?

No, el producto filamentosos que obtenemos de la extracción no es ADN puro ya que también podemos encontrar en él fragmentos de ARN:

**Protocol experimental – Electroforesis**

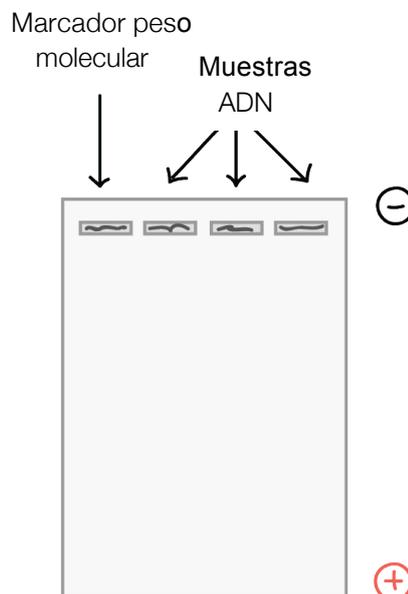
- Hay que añadir en un tubo de 1,5 ml en un tubo de 1,5 ml:
  - X cantidad de muestra (extracción de ADN)
  - X cantidad de colorante Orange G 5x (tener en cuenta que la concentración final tiene que ser 1x) Para tener un volumen final de 30 µl.

Cálculos: Los siguientes cálculos son para saber qué tenemos que añadir a cada tubo de 1,5 ml.  $30 \mu\text{l} \times \frac{1}{5} = 6 \mu\text{l}$

Orange G 5X

Orange G 5X + 24 µl de muestra (extracción ADN obtenida)

- 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).
- Hay que cargar el 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).
- Se tiene que cargar en el gel 20 µl de la disolución anterior (muestra + Orange G) en el carril del gel que corresponda a cada grupo.



- Hay que programar la fuente de electroforesis a 100 voltios durante 20 minutos.
- Visualización del gel de electroforesis mediante una lámpara de luz ultravioleta (UV).

## Sesión 3

Para las soluciones a las preguntas de esta sesión, véanse los comentarios correspondientes a cada caso que encontraréis a los anexos del guion.