



## Elaboración de un modelo de CRISPR-Cas9 de papel

### DESCRIPCIÓN GENERAL

El sistema CRISPR-Cas9, comúnmente conocido como CRISPR, se menciona con frecuencia en las noticias por su potencial para tratar enfermedades genéticas. En esta actividad, los estudiantes exploran y aprenden sobre esta herramienta biotecnológica al construir un modelo de papel bidimensional del sistema CRISPR. Después, aplican sus conocimientos sobre el apareamiento de bases complementarias para simular cómo el sistema CRISPR se dirige a secuencias de ADN específicas. Se pide a los estudiantes que comparen su modelo de papel con uno tridimensional disponible en línea. En una extensión opcional, los estudiantes ven y reflexionan sobre algunos videos donde personas de la comunidad científica explican cómo utilizan el sistema CRISPR en sus investigaciones.

En la [página web de este recurso](#) se encuentra información adicional relacionada con la pedagogía y la implementación, incluida la audiencia sugerida, el tiempo estimado y las relaciones con el plan de estudios.

### CONCEPTOS CLAVE

- El sistema CRISPR-Cas9 puede ser utilizado para reconocer genes específicos en el genoma de un organismo.
- El sistema CRISPR-Cas9 puede ser diseñado para inactivar genes o para editarlos.
- El sistema CRISPR-Cas9 es una herramienta biotecnológica versátil que se puede modificar fácilmente de acuerdo con las necesidades de un proyecto de investigación.

### OBJETIVOS DE APRENDIZAJE PARA EL ESTUDIANTE

- Aplicar los conocimientos sobre la estructura, función y apareamiento de bases del ADN para describir cómo el sistema CRISPR-Cas9 puede utilizarse para inactivar y editar genes.
- Comparar dos modelos diferentes de un proceso biológico.
- Explorar diferentes tipos de proyectos de investigación que utilizan la tecnología CRISPR-Cas9 (extensión).

### CONOCIMIENTO PREVIO

Los estudiantes deben:

- conocer las funciones del ADN y el ARN en el almacenamiento, expresión y transmisión de información genética.
- tener conocimientos básicos sobre los procesos de replicación del ADN, ya que la tecnología CRISPR-Cas9 implica muchos pasos similares, como el corte del ADN y el apareamiento de bases.

### MATERIALES

- acceso al *Haz clic & aprende* [CRISPR-Cas9: Mecanismo y aplicaciones](#)
- copias de la “Hoja de trabajo para el estudiante”
- copias de las hojas de los modelos de “Cas9” y del “ARN y ADN” (o modelos cortados previamente/preensamblados)
- tijeras
- cinta adhesiva transparente

## INFORMACIÓN GENERAL

El sistema CRISPR-Cas9 (con frecuencia abreviado como CRISPR) es una tecnología que le permite a la comunidad científica editar el ADN de una célula. Desde que se describió por primera vez en 2012, este sistema ha generado mucho interés por su notable potencial para tratar enfermedades genéticas y, a la vez, por sus posibles problemas éticos y de seguridad, como la creación de bebés de diseño y superhumanos. El sistema CRISPR se descubrió por primera vez en bacterias, donde actúa como un tipo de sistema inmunitario. La comunidad científica modificó el sistema bacteriano para producir una herramienta biotecnológica para editar el ADN.

Las tecnologías basadas en el CRISPR son muy utilizadas en la investigación y se han aplicado en una gran variedad de estudios biológicos. Además, se están desarrollando tratamientos que utilizan CRISPR para tratar diversas enfermedades genéticas, como [la anemia de células falciformes](#) y la fibrosis quística. La tecnología es relativamente barata, fácil de usar y le permite a la comunidad científica formular nuevas preguntas y obtener resultados más rápidos.

El *Haz clic & aprende* [CRISPR-Cas9: Mecanismo y aplicaciones](#) proporciona más información sobre cómo funciona el sistema CRISPR y cómo lo utiliza la comunidad científica. El *Haz clic & aprende* [Dogma central y medicina genética](#) explora cómo se pueden utilizar el sistema CRISPR y otras tecnologías para tratar enfermedades genéticas. Para ver imágenes tomadas bajo el microscopio del sistema CRISPR-Cas9 en acción sobre una célula, consulta [Shibata et al. \(2017\)](#), un artículo de libre acceso de *Nature*.

Esta actividad es una adaptación de un modelo desarrollado por el Dr. David Wollert de Chattanooga State Community College, que muestra algunos de los componentes y procesos clave del sistema CRISPR. La actividad explora dos aplicaciones diferentes del sistema CRISPR, la inactivación de genes (“knockout”) y la edición genética, y cómo se valen de los procesos celulares para reparar rupturas bicatenarias del ADN.

- La inactivación genética mediante el sistema CRISPR utiliza la **unión de extremos no homólogos (NHEJ, por sus siglas en inglés)**, que es el principal proceso celular para reparar rupturas del ADN bicatenario. Los estudiantes tal vez se pregunten cómo CRISPR puede causar mutaciones mediante este mecanismo. Durante la NHEJ, los extremos rotos del ADN se vuelven a unir. Este proceso puede ser propenso a errores, ya que a veces los nucleótidos se separan de los extremos rotos y la maquinaria de reparación de la célula los vuelve a añadir de forma incorrecta. Si la NHEJ repara correctamente la secuencia de ADN, la enzima Cas9 se unirá a dicha secuencia a través del ARN guía y cortará de nuevo el ADN. Aunque la célula puede seguir reparando el ADN, la enzima Cas9 continuará cortándolo hasta que la célula añada nucleótidos incorrectos, lo que suele hacer que el gen pierda su función. Una vez que la secuencia de ADN tiene los nucleótidos incorrectos, la enzima Cas9 no la volverá a cortar porque el ARN guía ya no coincidirá ni se unirá al ADN.
- La edición genética con el sistema CRISPR utiliza la **reparación por recombinación homóloga (HDR, por sus siglas en inglés)**, un proceso de reparación que las células utilizan poco después de la replicación del ADN en las fases S y G2, cuando las cromátidas hermanas están presentes y pueden servir como plantillas para reparar las rupturas. Puesto que la HDR las repara mediante la copia de una plantilla homóloga, es más exacta que la NHEJ. Al utilizar la tecnología CRISPR-Cas, los investigadores suministran la plantilla homóloga en forma de “ADN donador” para que la célula repare la ruptura del ADN bicatenario con la HDR, en lugar de la NHEJ. Los científicos pueden diseñar la plantilla homóloga para incorporar una nueva secuencia o para corregir una ya existente en una célula.

Esta actividad muestra cómo dos secuencias específicas de ADN se podrían reconocer mediante la tecnología CRISPR-Cas9. Ambas secuencias **objetivo** provienen de genes reales:

- La secuencia de ADN objetivo 1 procede del gen humano *MC1R*. Este gen se asocia con la producción de melanina en la piel y el cabello. En esta actividad, el sistema CRISPR-Cas9 se utiliza para inactivar el gen, con lo que se esperaría que hubiera un cambio en la coloración.
- La secuencia de ADN objetivo 2 procede de un gen denominado *MYBPC3*. Una delección de cuatro bases (GAGT) en este gen causa una enfermedad genética denominada miocardiopatía hipertrófica. Esta enfermedad ocurre en 1 de cada 500 nacimientos, lo que la convierte en una de las afecciones cardíacas genéticas más comunes. Puede provocar ataques cardíacos en adultos y es una causa frecuente de muerte súbita en atletas jóvenes sanos. Como se muestra en esta actividad, el sistema CRISPR-Cas9 se ha utilizado para editar la mutación del gen *MYBPC3* en células humanas embrionarias mediante la inserción de la secuencia GAGT ausente ([Ma et al. 2017](#)).

Hay que tener en cuenta que el modelo de papel del sistema CRISPR está simplificado. Por ejemplo:

- El ARN guía real es mucho más largo que los que se muestran en el modelo de papel. En realidad, cada ARN guía tiene una forma tridimensional compleja con varios bucles y giros bicatenarios. Esta forma tridimensional permite la unión del ARN guía con la nucleasa Cas9 de manera parecida a un sustrato que se une a una enzima. Para obtener más información sobre cómo el ARN puede formar estructuras tridimensionales, ve el video [RNA folding](#) (recurso en inglés) con la participación de Thomas Cech, Premio Nobel de Química.
- En la célula, la enzima Cas9 se une a secuencias PAM, que existen en todo el genoma. Una vez que se une a una de ellas, la Cas9 desenrolla la doble hélice del ADN. Este paso no se muestra en el modelo de papel. Si el ARN guía coincide con el ADN objetivo, se unirá a una de las dos hebras del ADN mediante el apareamiento de bases complementarias para formar una hélice de ADN-ARN. Este paso tampoco se muestra en el modelo.
- Las vías de reparación del ADN son más complejas de lo que se muestra en este modelo. Por ejemplo, en la parte del modelo que abarca la reparación por recombinación homóloga, puede parecer que el ADN donador se empalma directamente en el ADN objetivo y sustituye partes de la secuencia objetivo. En realidad, la reparación implica una recombinación homóloga entre el ADN donador y el ADN objetivo.

## CONSEJOS DIDÁCTICOS

- Además del *Haz clic & aprende* [CRISPR-Cas9: Mecanismo y aplicaciones](#), esta actividad se puede combinar con otros recursos de BioInteractive sobre el sistema CRISPR:
  - La actividad [Using CRISPR to Identify the Functions of Butterfly Genes](#) (<https://www.biointeractive.org/classroom-resources/using-crispr-identify-functions-butterfly-genes>) (recurso en inglés) explora cómo la comunidad científica ha utilizado la tecnología CRISPR para inactivar genes que afectan los colores y patrones de las alas de las mariposas. Los estudiantes diseñan su propio ARN guía para inactivar el gen de una mariposa y examinar el fenotipo resultante. Esta investigación también se discute en los videos de Robert Reed ubicados en la pestaña “Cómo se usa” del *Haz clic & aprende*.
  - En la actividad [Winginq It: Analyzing a Scientific Paper](#) (recurso en inglés) los estudiantes analizan partes del artículo científico ([Zhang et al. 2017](#)) sobre la investigación presentada en la actividad anterior [Using CRISPR to Identify the Functions of Butterfly Genes](#). La actividad [Winginq It: Analyzing a Scientific Paper](#) es más adecuada para una audiencia universitaria.
  - El *Haz clic & aprende* [Dogma central y medicina genética](#), la hoja de trabajo que acompaña este recurso y el cortometraje [Usando genes como medicinas](#) muestran cómo el sistema CRISPR y otras herramientas biotecnológicas pueden ser empleadas para tratar enfermedades genéticas.

- Construir el modelo implica cortar varias piezas pequeñas. Si a algunos estudiantes les resulta difícil realizar esta tarea, organiza la actividad de tal manera que cuenten con diferentes formas de elaborar los modelos. Puede ser útil darles las piezas cortadas previamente o modelos preensamblados o agruparlos para que puedan dividirse la tarea.
- Para utilizar los modelos para varias secciones de una misma clase o durante varios años, puedes cortar y plastificar las piezas del modelo. Asegúrate de que las piezas encajen después de haberlas plastificado.
- Verifica que la abertura debajo de la pestaña que está más a la derecha del modelo sea lo suficientemente ancha para que las piezas de ARN y ADN puedan introducirse. Evita colocar cinta adhesiva sobre los bordes largos de la pestaña, ya que podría resultar difícil deslizar las piezas de ARN y ADN.
- Los estudiantes deben buscar coincidencias exactas entre el ARN guía y el ADN objetivo, donde la U (uracilo) del ARN coincida con la T (timina) del ADN.
- En la “Hoja de trabajo para el estudiante” de esta actividad, los estudiantes construyen el modelo de papel (Parte 1) antes de analizar el modelo disponible en línea del *Haz clic & aprende* sobre el CRISPR (Parte 2). La actividad funciona de la misma manera si se invierte el orden. Para ello, pide a los estudiantes que completen la tabla de la Parte 2 antes de hacer el modelo de papel de la Parte 1. Luego pueden regresar al *Haz clic & aprende* -según sea necesario- para responder las preguntas al final de la Parte 2, que sirven para hacer comparaciones entre ambos modelos y para completar la extensión.
- Si lo consideras adecuado para tu clase, puedes moderar un debate sobre las cuestiones éticas de la edición genética. La edición del gen *MYBPC3*, que se presenta en el ADN objetivo 2, se puede utilizar como punto de partida. El equipo de investigación editó el gen *MYBPC3* en ovocitos humanos que más tarde fueron fecundados y se les permitió desarrollarse hasta las etapas de ocho células y de blastocisto (Ma *et al.* [2017](#)).

## CLAVE DE RESPUESTAS

### PARTE 1: Un modelo de papel del sistema CRISPR-CAS9

1. Preguntas sobre el ADN objetivo 1:
  - a. Anota la secuencia del ARN guía 1 que se une al ADN y la secuencia complementaria del ADN 1 a la que se une. Identifica los extremos 5' y 3' de ambas hebras.  
**ARN: 5'-CCCACAGCCAUCCCCAGCU-3'**  
**ADN: 3'-GGGTGTCGGTAGGGGTCGA-5'**
  - b. Compara las secuencias del modelo que acabas de armar con las de tu respuesta a la pregunta 1a. ¿Cómo cambió la secuencia del gen debido al sistema CRISPR-Cas9? ¿Dónde se realizó este cambio (en el ARN, en una hebra de ADN o en ambas)?  
***Se insertaron nucleótidos de manera aleatoria en la secuencia del gen. Los estudiantes también pueden mostrar la secuencia específica en donde se integraron los nucleótidos. El cambio se hizo en ambas hebras de ADN.***
  - c. ¿Cómo podría este cambio inactivar o bloquear un gen?  
***Estos cambios pueden inactivar un gen al impedir la producción de una proteína funcional. Por ejemplo, los nucleótidos insertados de manera aleatoria en la secuencia del gen pueden hacer que codifique para los aminoácidos equivocados, lo que resulta en una proteína no funcional. (Es posible que la proteína siga funcionando si la mutación resultante es silenciosa. Esto podría suceder si se insertan tres nucleótidos exactamente en el lugar de la ruptura, lo que resultaría en una mutación dentro del marco de lectura).***

***A continuación, se muestra el modelo final del ADN objetivo 1 (reparación con NHEJ). Este modelo***





**PARTE 2: Exploración interactiva del sistema CRISPR**

1. Con la información del *Haz clic & aprende*, resume cada paso del sistema CRISPR-Cas9 en la siguiente tabla. **Los resúmenes de los estudiantes variarán. A continuación, se muestran algunos ejemplos.**

Paso	Resumen
<b>Reconocimiento</b>	<b>La Cas9 se une de manera aleatoria a una secuencia de tres nucleótidos denominada PAM (5'-NGG-3', donde N representa cualquier nucleótido), que es abundante en todo el genoma humano.</b>
<b>Unión</b>	<b>La Cas9 desenrolla la hélice de ADN aguas arriba de la secuencia PAM. Si la secuencia de ADN coincide con la del ARN guía, el ARN y el ADN complementario se unirán para formar una doble hélice de ARN-ADN.</b>
<b>Corte</b>	<b>Se acciona la actividad nucleasa de la Cas9. Esta corta ambas hebras del ADN tres nucleótidos aguas arriba de PAM.</b>
<b>Reparación del ADN</b>	<b>Las enzimas de reparación corrigen la ruptura del ADN. Si NO existe una plantilla homóloga, la célula repara la ruptura mediante la unión de extremos no homólogos (NHEJ), un proceso de reparación más propenso a errores que puede dar lugar a una mutación que inactiva el gen. Si se dispone de una plantilla homóloga, la célula repara la ruptura mediante la reparación por recombinación homóloga (HDR), que se puede manipular para cambiar la secuencia del ADN objetivo.</b>

2. ¿Cuál es una de las limitaciones del modelo de papel en comparación con el modelo interactivo de la actividad del *Haz clic & aprende*?  
**Las respuestas de los estudiantes van a variar. Ejemplos: El modelo de papel es bidimensional y menos detallado, no representa la formación de la hélice de ADN-ARN, no refleja la estructura real del ARN guía, etc.**
3. ¿Cuál es una de las limitaciones del modelo del *Haz clic & aprende* en comparación con el modelo de papel?  
**Las respuestas de los estudiantes van a variar. Ejemplos: El modelo de la actividad del *Haz clic & aprende* no muestra secuencias reales (por lo que no se puede ver el apareamiento de bases complementarias), es una animación fija por lo que no se puede manipular, etc.**
4. ¿Cuál es una de las limitaciones de ambos modelos en comparación con el estudio del proceso en una célula real?  
**Las respuestas de los estudiantes van a variar. Ejemplos: Ninguno de los dos modelos incluye a las otras proteínas celulares, ninguno muestra cómo funciona realmente la reparación del ADN, ninguno refleja la escala temporal real del proceso, etc.**

**PARTE 3: Extensión de la exploración interactiva del modelo (opcional)**

**Las respuestas de los estudiantes van a variar según las personas de la comunidad científica y los videos que hayan seleccionado. Puedes discutir en clase posibles respuestas a la última pregunta (“¿Qué otra duda tienes sobre el sistema CRISPR-Cas9?”).**

**REFERENCIA**

Ma, Hong, Nuria Marti-Gutierrez, Sang-Wook Park, Jun Wu, Yeonmi Lee, Keiichiro Suzuki, Amy Koski, et al.  
“Correction of a pathogenic gene mutation in human embryos.” *Nature* 548, 7668 (2017): 413–419.  
<https://doi.org/10.1038/nature23305>.

## CRÉDITOS

Escrito por Ann Brokaw, Rocky River High School, OH

Modelo impreso del sistema CRISPR desarrollado originalmente por David Wollert, Chattanooga State Community College, TN

Editado por Esther Shyu, Laura Bonetta, HHMI

Revisión científica a cargo de Vincent Buonaccorsi, Juniata College, PA

Traducido al español por UBIQUS; y editado por Lorena Villanueva-Almanza, Freelance Editor; Adriana Patricia López Oliver, UNAM y Zulmarie Pérez Horta, HHMI.