



## Uso de CRISPR para identificar la función de algunos genes en mariposas

### DESCRIPCIÓN GENERAL

El sistema CRISPR-Cas9, comúnmente conocido como CRISPR, es una herramienta biotecnológica con la que se pueden inactivar o bloquear genes (también denominado como “knockout”). En esta actividad, los estudiantes exploran el uso del sistema CRISPR-Cas9 para inactivar genes de algunas mariposas y determinar su función. Primero, los estudiantes aprenden cómo el sistema CRISPR-Cas9 reconoce y modifica una secuencia objetivo en el ADN. Después, diseñan su propio sistema CRISPR-Cas9 para inactivar un gen de una mariposa y analizan el fenotipo resultante. La actividad incluye una extensión opcional en la que los estudiantes aplican lo aprendido para determinar la función de un gen diferente. Esta actividad puede utilizarse para revisar los conceptos de apareamiento de bases complementarias, relaciones genotipo-fenotipo y mutaciones.

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 sus relaciones con el plan de estudios.

### CONCEPTOS CLAVE

- El sistema CRISPR-Cas9 puede ser utilizado para inactivar genes específicos en el genoma de un organismo.
- Una hebra de ARN puede unirse a una de ADN mediante el apareamiento de bases complementarias.
- Los cambios en la secuencia de ADN en un exón de un gen pueden afectar al fenotipo de un organismo.

### OBJETIVOS DE APRENDIZAJE PARA EL ESTUDIANTE

- Identificar secuencias de bases complementarias para diseñar una herramienta biotecnológica.
- Interpretar la relación entre genotipo y fenotipo de un rasgo particular.

### CONOCIMIENTO PREVIO

Los estudiantes deben estar familiarizados con:

- el proceso de expresión génica
- la diferencia entre intrones y exones
- la relación entre genotipo y fenotipo
- las reglas de apareamiento de bases de ADN
- la estructura del ARN

### MATERIALES

- copias de la “Hoja de trabajo para el estudiante”
- acceso al *Haz clic & aprende* [CRISPR-Cas9: Mecanismo y aplicaciones](#)
- (opcional) imágenes a color de las “Fotos de mariposas”, que son versiones ampliadas de las Figuras 2–6 de la “Hoja de trabajo para el estudiante”.

### 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 y puede utilizarse para inactivar genes, un proceso al que también se le conoce como “knockout”. Desde que se identificó por primera vez en 2012, el sistema CRISPR ha generado mucho interés por su notable potencial tanto en la investigación como en la medicina. Este sistema 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 CRISPR han sido muy utilizadas en la investigación y se han aplicado en una gran variedad de estudios biológicos. 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.

## CONSEJOS DIDÁCTICOS

- La sección “Cómo funciona” del *Haz clic & aprende* [CRISPR-Cas9: Mecanismo y aplicaciones](#) aborda prácticamente la misma información que la Parte 1 de esta actividad. Puede ser útil que los estudiantes exploren primero el *Haz clic & aprende* y después realicen la Parte 1 como repaso.
- Además del *Haz clic & aprende* sobre el sistema CRISPR, esta actividad puede combinarse con otros recursos de BioInteractive sobre CRISPR:
  - En la actividad [Elaboración de un modelo de CRISPR-Cas9 de papel](#), los estudiantes construyen y analizan un modelo de papel del sistema CRISPR. Esta actividad es adecuada tanto para clases de bachillerato como de nivel universitario.
  - En la actividad [Winging It: Analyzing a Scientific Paper](#) (recurso en inglés), los estudiantes analizan partes del artículo de investigación ([Zhang et al. 2017](#)) del que forman parte las Figuras 2–4 de la “Hoja de trabajo para el estudiante”. La actividad [Winging 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.
- Para hacer más eficiente el tiempo de clase, los estudiantes podrían hacer parte de esta actividad como tarea (por ejemplo, la pregunta del *Haz clic & aprende* al final de la Parte 3 o la extensión opcional).
- El archivo PDF “Fotografías de mariposas” contiene versiones ampliadas de las Figuras 2–6 de la “Hoja de trabajo para el estudiante”. Estas imágenes deben mostrarse a color. Se pueden proyectar en una pantalla si la impresión a color no está disponible. Otra opción es compartir las imágenes en línea.
- 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 que utiliza la célula para reparar rupturas del ADN bicatenario. Los estudiantes tal vez se pregunten cómo CRISPR puede causar mutaciones utilizando este proceso. 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 incorrectamente. Si la NHEJ repara correctamente la secuencia de ADN, la enzima Cas9 simplemente se unirá a la secuencia utilizando el ARN guía y cortará de nuevo el ADN. Aunque la célula puede seguir reparando el ADN, la enzima Cas9 seguirá cortándolo hasta que la célula finalmente añada los nucleótidos incorrectos, lo que a menudo hace que el gen pierda su función. Una vez que la secuencia de ADN tiene los nucleótidos incorrectos, la enzima Cas9 no lo volverá a cortar, porque el ARN guía ya no coincidirá ni se unirá al ADN.

## CLAVE DE RESPUESTAS

### PARTE 1: Uso del sistema CRISPR-Cas9 para inactivar genes

1. Analiza con tu compañero qué significa inactivar un gen y cómo se puede hacer. Anota tus ideas.  
**Inactivar un gen significa impedir que se exprese como proteína. Las ideas de los estudiantes sobre cómo inactivar un gen pueden variar. Pueden sugerir cambiar la secuencia del gen para que ya no produzca una proteína funcional o utilizar un represor transcripcional o ARN de interferencia para impedir que se produzca la proteína.**
2. ¿Se te ocurren otras formas de averiguar qué hacen los genes? Anota una o dos ideas.  
**Las respuestas pueden variar, pero podrían incluir ideas como el análisis de la secuencia de ADN del gen y la búsqueda de genes similares con funciones conocidas en otras especies. Otra opción sería expresar el gen en una bacteria para producir una proteína y después analizar su función.**
3. La siguiente parte de una secuencia genética (ADN) contiene múltiples secuencias PAM. Identifica **seis de ellas** en la hebra superior (5' a 3').

```
5'-GCACGGCGGAGCGGTTCTTGGCAGCGGCCGCACGATCTCGTTGCCGCGG-3'
3'-CGTGCCGCCTCGCCAAGAACCGTCGCCGCGTGCTAGAGCAACGGCGGCC-5'
```

4. A continuación, se muestra parte de una secuencia de un ARN guía. La sección subrayada está diseñada para que coincida con una secuencia específica del ADN objetivo.

```
5'-GGCGGAGCGGUUCUUGGCAGGUUUUAGAGCUAGAAAUAGC-3'
```

Revisa nuevamente la secuencia genética. Contiene una secuencia del ADN objetivo que coincide con el ARN guía anterior. Identifica la **única secuencia PAM** en la hebra superior (5' a 3') que está *junto* a la secuencia del ADN objetivo.

```
5'-GCACGGCGGAGCGGTTCTTGGCAGCGGCCGCACGATCTCGTTGCCGCGG-3'
3'-CGTGCCGCCTCGCCAAGAACCGTCGCCGCGTGCTAGAGCAACGGCGGCC-5'
```

5. Anota la secuencia del ARN guía que se une al ADN y la secuencia a la que se une (el complemento del ADN objetivo). Identifica los extremos 5' y 3' de las hebras de ARN y de ADN.  
**ARN: 5'-GGCGGAGCGGUUCUUGGCAG-3'**  
**ADN: 3'-CCGCCTCGCCAAGAACCGTC-5'**
6. A continuación, vuelve a escribir la secuencia del ADN objetivo y su complemento, indica con un espacio o una línea vertical (|) el sitio donde la enzima Cas9 cortaría ambas hebras del ADN.  
**5'-GGCGGAGCGGTTCTTGG CAG-3'**  
**3'-CCGCCTCGCCAAGAACC GTC-5'**
7. Los errores en la reparación del ADN consisten en la eliminación o inserción de nucleótidos de manera aleatoria en el sitio del corte. Explica cómo estos cambios pueden inactivar un gen.  
**Los nucleótidos insertados o eliminados de manera aleatoria pueden inactivar un gen al impedir la producción de una proteína funcional. Por ejemplo, estos cambios pueden hacer que la secuencia del gen codifique para los aminoácidos equivocados, dando lugar a una proteína no funcional. (Es posible que la proteína siga funcionando si la mutación resultante es una mutación 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).**

**PARTE 2: Inactivación de los genes de las mariposas**

1. ¿Qué son los exones y los intrones y en qué se diferencian?

**Los exones son las partes de los genes que codifican para la producción de proteínas. Se transcriben en ARN mensajero (ARNm) y luego se traducen en proteínas. Los intrones son las partes de los genes que no codifican para la producción de proteínas. Estos últimos se eliminan del ARNm antes de su traducción mediante el corte y empalme del ARN.**

2. En la Figura 1 se observa que todas las secuencias del ADN objetivo se encuentran en los exones. ¿Por qué la comunidad científica se concentra en las secuencias ubicadas en los exones en lugar de las que están en los intrones cuando inactiva genes?

**Los exones son las partes del gen que serán traducidas en una proteína. Así que, es más probable que los cambios en la secuencia del ADN de los exones afecten a la proteína y, por lo tanto, su función.**

**PARTE 3: Diseño de un ARN guía**

1. Subraya una **secuencia del ADN objetivo** de 20 nucleótidos en la hebra superior (5' a 3') del exón anterior. Recuerda que debe estar aguas arriba (en el extremo 5') al lado de una secuencia PAM (5'-NGG-3').
2. Identifica y resalta la **secuencia PAM** que está junto a la del ADN objetivo que hayas subrayado. Aquí es donde se unirá la Cas9.

**Hay varias respuestas correctas para 1 y 2. A continuación, se muestra un ejemplo.**

```

5'-CGACACCGGTTCCAGCGCTCGAGCCACGCGAAGCTTCAGGCGCTGTGGCTGGAAG
3'-GCTGTGGCCAAGGTCGCGAGCTCGGTGCGCTTCGAAGTCGCGACACCGACCTTC

CGCACTACCAGGAAGCGGAGCGCCTCCGCGGTCGCCGCTCGGGCCCGTCGACAA
GCGTGATGGTCTTCGCTCGCGGAGGCGCCAGCGGGCGAGCCCGGGCAGCTGTT

GTACCGGGTGC GGAAGAAGTTCCTCTGCCGAGGACTATTTGGGACGGCGAACAG-3'
CATGGCCACGCCTTCTCAAGGGAGACGGCTCTGATAAACCTGCCGCTTGTC-5'

```

3. A continuación, vuelve a escribir la secuencia del ADN objetivo y su complemento, indica con un espacio o una línea vertical (|) el sitio donde la enzima Cas9 cortaría ambas hebras del ADN.  
**Las respuestas variarán según la secuencia elegida. La respuesta correspondiente al ADN objetivo anterior es:**

**5'-CTCGAGCCACGCGAAGC TTC-3'**  
**3'-GAGCTCGGTGCGCTTCG AAG-5'**

4. Anota la **secuencia del ARN guía** de 20 nucleótidos que coincida con la del ADN objetivo que hayas elegido. Esta secuencia *no* debe incluir la secuencia PAM.

**Las respuestas variarán según la secuencia elegida. La respuesta que corresponde a la secuencia anterior es:**

**5'-CUCGAGCCACGCGAAGCUUC-3'**

5. En el laboratorio de Robert Reed, en la Universidad de Cornell, se diseñaron ARN guías para inactivar el gen *optix* en tres especies de mariposas: dama pintada (*Vanessa cardui*), ojo de venado común (*Junonia coenia*) y voladora del Golfo (*Agraulis vanillae*). En las Figuras 2–4 se comparan las alas de las mariposas tipo silvestre (control) con las de las de aquellas cuyo gen *optix* fue inactivado.
  - a. Para cada especie mostrada, describe cómo se diferencian las alas de las mariposas de tipo silvestre (control) con aquellas en las que se inactivó el gen *optix*.

**Las respuestas van a variar según las observaciones de los estudiantes. Es posible que algunas**

**incluyan la desaparición del color naranja, la aparición del color azul o la eliminación de algunas rayas y patrones en las alas de las mariposas en las que se inactivó el gen *optix*.**

- b. Con base en las figuras, determina la función del gen *optix*. ¿Cumple el gen la misma función en las tres especies de mariposas? Si no es el caso, explica cómo varía entre las tres especies.

**Las respuestas van a variar según las observaciones de los estudiantes. Pueden decir que el gen *optix* tiene una función parecida en las tres especies y que dicha función está relacionada con los colores y patrones en las alas de las mariposas. En dos especies, el principal efecto de inactivar el gen parece ser la pérdida del color naranja. En la tercera, la inactivación del gen parece provocar que las alas sean más azules.**

- c. Utiliza evidencia de las tres figuras para justificar tu predicción. Especifica tu respuesta.

**Las respuestas van a variar según las observaciones de los estudiantes. En *V. cardui*, las alas de la mariposa de tipo silvestre tienen muchas áreas de color naranja, mientras que las de la mariposa con el gen *optix* inactivado no tienen ninguna zona de color naranja. Las alas de la especie *A. vanillae*, que son de color naranja en mariposas de tipo silvestre, se han vuelto negras con la inactivación. Las alas de *J. coenia* con el gen *optix* inactivado tampoco tienen zonas de color naranja, en su lugar, presentan áreas de color azul.**

6. Abre el [Haz clic & aprende CRISPR-Cas9: Mecanismo y aplicaciones](#) y dirígete a la pestaña “Cómo se usa”. Desplázate por los videos que se encuentran en la parte derecha de la pantalla y mira las tres entrevistas con Robert Reed. Usa la información de estos videos para revisar tus respuestas a la pregunta 5.

**Las revisiones de los estudiantes van a variar. En los videos se menciona que inactivar el gen *optix* provoca cambios en el color, y que estos cambios varían según la especie de mariposa.**

#### EXTENSIÓN: Determinar la función de un gen diferente

1. A continuación, se muestra parte de la secuencia de un exón del gen *spalt* de la mariposa. Esta vez, solo se muestra una de las hebras del ADN.
- a. Subraya una **secuencia del ADN objetivo** de 20 nucleótidos en el exón anterior. Recuerda que debe estar situada aguas arriba de una secuencia PAM.
- b. Identifica y resalta la **secuencia PAM** que está junto a la del ADN objetivo que hayas subrayado. **Hay varias respuestas correctas para a y b. A continuación, se muestra un ejemplo.**

```
5'CGATATCTGGACCAATTTCAATAGCAACAGGACTACGTACTTTTCCTTCATATCCACTATTTCCAAA
TTCCCACCAAGCAGTGTCTCATCTGGATGTCTTACACCTTTCCAAAGTAATCCCAACAGCATAATAG
ACAGTGACATAACTCGTGATCCCATATTTATAATTCACCTTTACCGCGTCCTGGAAGTAATGACAAC
TCTTGGGAAAGTTTGATTGAAATTACTAAAACCTTCAGAAACGTCAAATTGCAACAGTTAGTAGATA
ATATTGATAACAAAGTTACTGATCCTAACGAGTGTATTGTATGTCATCGCGTCTTATCTTGTAAGT
GCTTTACAGATGCACTACCGAACTCATACTGGGAAAGACCTTTCAGATGTAAATTGTGCGGTCGTG
CTTTACTACAAAGGGCAATTTAAAACCTCATATGGGTGTCCATCG-3'
```

- c. Vuelve a escribir la secuencia del ADN objetivo, indica con un espacio o una línea vertical (|) el sitio donde la enzima Cas9 cortaría el ADN.

**Las respuestas variarán según la secuencia elegida. La respuesta correspondiente a la secuencia anterior es:**

**5'-ATGCACTACCGAACTCA TAC-3'**

2. Anota la **secuencia del ARN guía** de 20 nucleótidos que coincida con la del ADN objetivo que hayas elegido. **Las respuestas variarán según la secuencia elegida. La respuesta correspondiente a la secuencia**

**mencionada es:**

**5'-AUGCACUACCGAACUCAUAC-3'**

3. Las personas del laboratorio de Reed utilizaron el sistema CRISPR-Cas9 para inactivar el gen *spalt* en dos especies de mariposas: *V. cardui* y *J. coenia*. En las Figuras 5 y 6 se comparan las alas de las mariposas de tipo silvestre con las de aquellas cuyo gen *spalt* fue inactivado.
- a. Para cada especie mostrada, describe cómo se comparan las alas de las mariposas de tipo silvestre con las de aquellas en las que se inactivó el gen *spalt*.  
**Las respuestas van a variar según las observaciones de los estudiantes. Algunas podrían incluir la eliminación, reducción o simplificación de los puntos de las alas o la modificación de los patrones de puntos o rayas en las que se inactivó el gen *spalt*.**
- b. Con base en las figuras, determina la función del gen *spalt*. ¿Cumple el gen la misma función en las tres especies de mariposas? Si no es el caso, explica cómo es diferente entre las tres especies.  
**Las respuestas van a variar según las observaciones de los estudiantes. Pueden decir que el gen *spalt* tiene una función parecida en las tres especies y que dicha función está relacionada con la formación de los puntos en las alas.**
- c. Utiliza evidencia de ambas figuras para justificar tu predicción. Especifica tu respuesta.  
**Las respuestas variarán según las observaciones de los estudiantes. Las alas de las mariposas de la especie *J. coenia* con el gen *spalt* inactivado carecen de puntos o, si los tienen, son de tamaño reducido.  
Las alas de las mariposas de la especie *V. cardui* con el gen *spalt* inactivado tienen puntos menos definidos y faltan algunos círculos y colores.**

## REFERENCIAS

Zhang, Linlin, Anyi Mazo-Vargas, and Robert D. Reed. "Single master regulatory gene coordinates the evolution and development of butterfly color and iridescence." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114, 40 (2017): 10707–10712. <https://doi.org/10.1073/pnas.1709058114>.

Zhang, Linlin and Robert D. Reed. "Genome editing in butterflies reveals that *spalt* promotes and *Distal-less* represses eyespot colour patterns." *Nature Communications* 7, 1 (2016): 11769. <https://doi.org/10.1038/ncomms11769>.

## CRÉDITOS

Escrito por Ann Brokaw, Rocky River High School, OH

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