

## 8. ANEXOS

### Anexo I. Objetivos de desarrollo sostenible



Producido en colaboración con **TROLLBÄCK + COMPANY** | TheGlobalGoals@trollback.com | +1.212.529.1010  
Para cualquier duda sobre la utilización, por favor comuníquese con: [dpicampaigns@un.org](mailto:dpicampaigns@un.org)

**Anexo II.** Fragmento de la posición nucleotídica 5190 a la 8080 del gen *FXN* [REF]. Se representa en mayúsculas el exón 1 (5190-5385) cuya CDS va desde la posición (5221 a la 5385) y en minúsculas parte del intrón 1; resaltado en azul se marca la zona aproximada de metilación (FRDA-DMR); resaltado en amarillo, verde y rosa se marca la secuencia guía sgRNA-AA, sgRNA-AB y sgRNA-AQ respectivamente; subrayado en negro se marca la secuencia PAM; de color rojo y subrayado se marca la secuencia de los primers FXN I exon 1A.dir y Edit WT qPCR deletion.rev respectivamente; en color morado y subrayado se marca la secuencia del primer Wt-edit qPCR deletion.dir; en color azul y subrayado se marca la secuencia del primer Intron FXN.rev; en en color amarillo y subrayado se marca la secuencia del primer Deletion FXN.dir; y por último, marcada con una llave se muestra la zona que se busca deleccionar, que contiene la región FRDA-DMR y la hiperexpansión del triplete GAA.

```

AGGGCGGAGCGGGCGGCAGACCCGGAGCAGCATGTGGACTCTCGGGCGCCGCGCAGTAGCCGGCCTCCTGGC
GTCACCCAGCCAGCCAGCCAGCCAGACCCTCACCCGGGTCCCGCGGCCGCGCAGAGTTGGCCCCACTCTGCGG
CCGCCGTGGCTGCGCACCGACATCGATGCGACCTGCACGCCCGCCGCGCAgtaagtatccgcgccgggaa
cagccgcggggcgcacgcgcgggcccgcacgcgcgcgcctcgcagggaggcgcgcgcacgcggggtcg
ctccgggtacgcgcgctggactagctcaccocgctcttctcagggcgcccgcggaagcggccttgcaac
tcccttctctggttctcccggttgcaatttcaactggcttctgctttccgaaggaaggggacattttgtcc
tgcggtgagactgcggtcaaggcacgggcgaaggcagggcaggctggtggaggggaccggttccgaggggt
gtgcggtgtctccatgcttgtcacttctctgcgataacttgtttcagtaataatagatggtatctgct
agtatatacacataacataatgtgtgtgtctgtgtgtatctgtatatagcgtgtgtgtgtgtgtgtgt
gcgcgcacgggcgcgcgcacacctaataattttcaaggctggattttttgaacgaaatgctttcctggaacg
aggtgaaacttcagagctgcagaatagctagagcagcagggccctggcttttgaaactgacccgacctt
tattccagattctgccccactccgcagagctgtgtgaccttggggattcccctaacctctctgagacgtgg
ctttgttttctgtagggagaagataaaggtagcgcaccttttgcggacctggtgtgaggattaaatgggaat
aacatagataaagtcttcagaacttcaaattagttcccttttcttctttgggggtacaaagaaatatctg
accagttacgccacggcttgaaaggaggaaacccaaagaatggctgtggggatgaggaagattcctcaagg
ggaggacatggtatthaatgagggcttgaagatgccaaaggaagtggtagaggggtgttcacgaggaggaa
ccgtctgggcaaaggccaggaaggcgaaggggatcccttcagagtggctggtacgccgatgtattagggg
agatgaaagaggcaggccacgtccaagccatatttgtgttctcctccgagtttgactttaggcttgaact
tcccacacgtgtattttggcccacattgtgttgaagaaactttgggattgggtgcccagtgcttaaaagtta
ggacttagaaaatggatttctggcaggacgcgggtggctcatgccataatctcagcactttgggaggccta
ggaagtggtatcacctgaggtccggagttcaagactaacctggccaacatggtgaaaccagtatctactaa
aaaatacaaaaaaaaaaaaaaaaaagaagaagaagaagaagaaataaagaaaagttagccgggctgtgtctg
cgcgctgtaatccagctactccagaggctgcggcaggagaatcgcttgagcccgggaggcagaggttgca
ttaagccaagatcgccaatgcactccggcctggcgacagagcaagactccgtctcaaaaaataataataa
taataaaaaataaaaaataaaatggatttccagcatctctggaaaaataggcaagtgtggccatgatggg
cttagatctcctctaggaagcagacatttattacttggcttctgtgactatctgagctgccacgtattgg
gcttccacccctgctgtgtggacagcatgggtgtcagcagagttgtgtttgtttgtttttgtttttgtgaca
gagtttccctctgttgccaggctggagtgcagtggctcagt

```

**Anexo III.** Tamaño y fragmentos generados tras la amplificación por PCR con los Primers de Edición (Primer FXN 1A.dir+ Edit WT qPCR deletion.rev). La edición génica usando las guías sgRNA-AA y sgRNA-AQ dan lugar al primer fragmento de la figura de un tamaño aproximado de 376 pb, mientras que la edición génica usando las guías sgRNA-AB y sgRNA-AQ dan lugar al segundo fragmento de la figura de un tamaño aproximado de 311 pb. Por otro lado, se muestra el tamaño y los fragmentos generados tras la amplificación por PCR con los Primers Internos 2 (WT-edit qPCR deletion.dir + intrón FXN.rev) que se corresponde con un tamaño de 238 pb y con los primers internos 1 (FXN deletion.dir + intrón FXN.rev) que se corresponde con un tamaño de 435 pb.

**Fragmento Primers Edición con las guías sgRNA-AA/sgRNA-AQ de 376 pb**

ACCGACATCGATGCGACCTGCACGCCCGCCGCGCAgtaagtatccgcgccgggaacagccgcgggcccgcac gccgcgggcccgcacgcccgcacgcctgcgcagggaggccgcgcacgcccgggtcgctccgggtacgcgcgc tggactagctcaccgcgctccttctcagggcgcccgccggaagcggccttgaactcccttctctggt **tct cccggttgcaattacactgg**cttctgcttccgaaggaaaagggacat tttgtcctgcggt **gcgactgcgg gtcaaggcactagatctcctctaggaagc**agacatttattacttggtctctgtgcactatctgagct gcca cgtattgggcttccac

**Fragmento Primers Edición con las guías sgRNA-AB/sgRNA-AQ de 311 pb**

ACCGACATCGATGCGACCTGCACGCCCGCCGCGCAgtaagtatccgcgccgggaacagccgcgggcccgcac gccgcgggcccgcacgcccgcacgcctgcgcagggaggccgcgcacgcccgggtcgctccgggtacgcgcgc tggactagctcaccgcgctccttctcagggcgcccgccggaagcggccttgaactcccttctctggt **tct cccggttgcaattacactagatctcctctaggaagc**agacatttattacttggtctctgtgcactatctga gct gccacgtattgggcttccac

**Fragmento Primers Internos 2 de 238 pb**

caggccacgtccaagccatatttgtgtgctctccggagtttactttaggcttgaacttcccacacgtgt tatttggcccacattgtgttgaagaaactttgggattggttgccagtgtttaaagttaggacttagaaaa tggatttctctggcaggacgcgggtggctcatgccataatctcagcactttgggaggcctaggaaggtgatc acctgaggtccggagttcaaga

**Fragmento Primers Internos 1 de 435 pb**

acccaaagaatggctgtggggatgaggaagattcctcaagggaggacatggtat ttaatgagggctcttga gatgccaaggaagtggtagaggggtttcacgaggagggaaccgtctgggcaaaggccaggaaggcggaagg gcatccctcagagtggctggtacgccgatgtattaggggagatgaaagagg caggccacgtccaagccat atttgtgttgcctccggagtttgtactttaggcttgaacttcccacacgtgttatttggcccacattgtgt ttgaagaaactttgggattggttgccagtgtttaaagttaggacttagaaaatggatttctctggcaggacg cggtggtcatgccataatctcagcactttgggaggcctaggaaggtggatc actgaggtccggagttca aga

**Anexo IV:** Condiciones óptimas de la PCR para los Primers de Edición (Primer FXN 1A.dir+ Edit WT qPCR deletion.rev). **A.** Volúmenes para la preparación del mix de PCR. \*Calculados para un pocillo, si se van a usar más pocillos habrá que recalcular los volúmenes. **B.** Programa del termociclador optimizado para el protocolo de PCR.

**A**

Reactivo	Volumen ( $\mu\text{L}$ )
Agua libre de RNAsas	Volumen restante hasta llegar a 25 $\mu\text{L}$ *
Buffer 10X with $\text{MgCl}_2$	2,5 $\mu\text{L}$ *
dNTPs (200 $\mu\text{M}/\mu\text{L}$ )	1 $\mu\text{L}$ *
Primers	1* $\mu\text{L}$ primer forward + 1* $\mu\text{L}$ primer reverse
DMSO	0,5 $\mu\text{L}$ *
Taq BioTools 1U/ $\mu\text{L}$	0,5 $\mu\text{L}$ *
Muestra (50 ng/ $\mu\text{L}$ )	Volumen para 50 ng/ $\mu\text{L}$
<b><i>Volumen total por pocillo</i></b>	<b><i>25 <math>\mu\text{L}</math></i></b>

**B**

<b>Activación</b>		
<b>96°C</b>	5 min	1 ciclo
<b>Amplificación</b>		
<b>96°C</b>	20 seg	
<b>57°C</b>	30 seg	30 ciclos
<b>72°C</b>	30 seg	
<b>Extensión Final</b>		
<b>72°C</b>	7 min	1 ciclo
<b>Mantenimiento</b>		
<b>4°C</b>	Infinito	

**Anexo V:** Condiciones óptimas de la PCR para los Primers Internos 1 (FXN deletion.dir + intrón FXN.rev).

**A.** Volúmenes para la preparación del mix de PCR. \*Calculados para un pocillo, si se van a usar más pocillos habrá que recalcular los volúmenes. **B.** Programa del termociclador optimizado para el protocolo de PCR.

**A**

Reactivo	Volumen ( $\mu\text{L}$ )
Agua libre de RNAsas	Volumen restante hasta llegar a 25 $\mu\text{L}$ *
Buffer 10X with $\text{MgCl}_2$	2,5 $\mu\text{L}$ *
dNTPs (200 $\mu\text{M}/\mu\text{L}$ )	1 $\mu\text{L}$ *
Primers	1 $\mu\text{L}$ * primer forward + 1 $\mu\text{L}$ * primer reverse
Taq BioTools 1U/ $\mu\text{L}$	0,5 $\mu\text{L}$ *
Muestra (50 ng/ $\mu\text{L}$ )	Volumen para 50 ng/ $\mu\text{L}$
<b><i>Volumen total por pocillo</i></b>	<b><i>25 <math>\mu\text{L}</math></i></b>

**B**

Activación		
<b>96°C</b>	5 min	1 ciclo
Amplificación		
<b>96°C</b>	20 seg	
<b>61°C</b>	30 seg	30 ciclos
<b>72°C</b>	30 seg	
Extensión Final		
<b>72°C</b>	7 min	1 ciclo
Mantenimiento		
<b>4°C</b>	Infinito	