



10524
**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

21

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN**

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLAN



Departamento de
Exámenes Profesionales

"DNA RECOMBINANTE : GUIA DIDACTICA PARA QFB"

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A :
LUZ VERONICA GARCIA FAJARDO

ASESOR: Q.F.B. MARIA ESTHER REVUELTA MIRANDA

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX. 2003

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

A



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTTLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS



**DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTTLAN
PRESENTE**

**ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuauttlán**

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

DNA recombinante: Guía didáctica para OEB

que presenta la pasante: Luz Verónica García Fajardo
con número de cuenta: 8909015-8 para obtener el título de :
Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuattlán Izcalli, Méx. a 2 de Mayo de 2003

PRESIDENTE

Dr. Ricardo V. Santiago Díaz

VOCAL

Q.F.I. Andrea A. Becerril Osaya

SECRETARIO

Q.F.B. María Esther Revuelta Miranda

PRIMER SUPLENTE

Q.F.B. Idalia Arilla Miyazawa

A Dios

Porque me ha permitido vivir hasta este día, porque me ha dado una madre sin la cual no sería lo que soy, porque tuve la fortuna de tener unos abuelos que fueron mi ejemplo de amor y responsabilidad. Porque tengo tíos y tías que me aman y se preocupan por mí. Porque mis hermanos Isaac e Israel crecieron conmigo formando una parte insustituible en mi vida. Porque he aprendido nuevas cosas con mi Padre. Gracias te doy Señor por permitirme estudiar en esta sagrada Institución y adquirir tantos conocimientos para desarrollarlos en beneficio de quien los necesite. Por poner en mi camino gente tan valiosa como mis profesores, compañeros y amigos, personas como María Esther y Renata que confiaron en mí y espero no defraudar nunca.

A mí

Porque sin mi esfuerzo y trabajo no podría haber terminado esto. Porque esta tesis representa todos los dolores y alegrías del pasado, todos los esfuerzos del presente y los mejores anhelos de mi futuro. Porque es una manera de corresponder a todo el amor que me han dado. A mi alma que espera ansiosa el momento de emprender el vuelo a su misión, sea cual sea, dedico estas páginas.

A todos aquellos lectores

Mi intención ha sido hacer un poco más comprensible esos temas relacionados con la célula que muchas veces nos hacen desesperar. Es mi deseo que este objetivo se logre y este viaje por la Biología Molecular y Genética sea un poco más fácil para ustedes.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

INDICE

	PAG
Objetivos	
Introducción	7
Capítulo 1. Historia de la Biología Molecular y Genética.	9
Capítulo 2. Estructura y Función del DNA y RNA.	
2.1 El DNA Y SU HISTORIA	35
2.1.1 La Desoxirribosa.	39
2.1.2 Las Bases.	40
2.1.3 El Grupo Fosfato.	41
2.2 Nucleósidos	41
2.3 Nucleótidos	42
2.3.1 La importancia celular de los nucleótidos.	42
2.4 Conformación del DNA	43
2.4.1 Características de una cadena de DNA.	44
2.4.2 Importancia del DNA.	45
2.4.3 Tipos de DNA.	46
2.4.4 Conformación de Superhélice.	47
2.5 El RNA	49
2.5.1 Tipos de RNA	51
2.6 El Dogma Central	
2.6.1 Transcripción	57
2.6.1.1 Transcripción en Procaríotes.	57
2.6.1.2 Transcripción en Eucariotes.	63
2.7 Maduración y Procesamiento del Transcrito Primario	73
2.7.1 Poliadenilación 3'	73
2.7.2 El mecanismo de remoción de Intrones y splicing de Exones.	76
2.7.2.1 Remoción del intrón en RNAm y empalme de exones.	77
2.8 Traducción	80
2.8.1 Los Ribosomas	80
2.8.2 El Código Genético	83
2.8.3 Traducción de la información genética en Procaríotes	85
2.8.4 El proceso de traducción en Eucariotes	90
2.9 Regulación De la Expresión Génica en Procaríotes	95
2.9.1 Operón Inducible: El Operón lac.	96
2.9.1.1 Control de la expresión del operón lac.	96
2.9.2 Operón Represible: El operón trp.	98
2.9.3 Control de la expresión génica en bacteriófagos.	98
2.9.3.1 Operones del fago λ.	98
2.9.4 Otros mecanismos de Control.	101

2.10 Mecanismos de la Regulación Génica en Eucariotes	102
2.10.1 Mecanismos de control a nivel de transcripción.	103
2.10.2 Mecanismos de control a nivel de procesamiento.	106
2.10.3 Mecanismos de control a nivel de traducción.	107
Capítulo 3. DNA Recombinante.	109
3.1 Fraccionamiento Celular.	111
3.2 Aislamiento y Purificación de DNA.	113
3.2.1 Protocolos para extracción y purificación de DNA.	113
3.2.1.1 Extracción Orgánica.	113
3.2.1.2 Precipitación con etanol.	113
3.2.1.3 El Método Glass Max	115
3.2.2 Análisis Espectrofotométrico de Acidos Nucleicos.	116
3.2.2.1 Recolección de datos.	116
3.2.2.2 Factores de conversión de concentración.	116
3.2.2.3 Estimación de pureza.	116
3.2.2.4 Tinción de Bromuro de Etidio.	116
3.3 Uso de Enzimas de Restricción.	117
3.3.1 Definición	117
3.3.2 Tipos de enzimas de restricción.	118
3.3.3 Enzimas de restricción tipo II.	118
3.3.3.1 Nomenclatura de algunas endonucleasas de restricción.	119
3.3.3.2 Extremos de fragmentos de restricción.	120
3.3.3.3 Extremos cohesivos compatibles.	124
3.3.3.4 Isosquisómeros.	125
3.3.4 probabilidad de reconocimiento por endonucleasas de restricción.	126
3.3.5 Definición de unidad.	126
3.3.6 Factores que afectan la actividad de endonucleasas de restricción.	126
3.3.6.1 Longitud del tiempo de incubación.	126
3.3.6.2 Buffer	128
3.3.6.3 DNA	129
3.3.6.4 Solventes no polares	129
3.3.6.5 Un número excesivo de unidades como promotor.	129
3.3.7 Guía para la digestión con endonucleasas de restricción.	129
3.3.8 Protocolo para la digestión con enzimas de restricción.	130
3.3.9 Manejo y almacenamiento de enzimas de restricción.	131
3.4 Separación de DNA por medio de Electroforesis en gel.	132
3.4.1 Objetivo	133
3.4.2 Protocolo	133
3.4.3 Características de la electroforesis de DNA.	135
3.4.3.1 Migración de moléculas de DNA en geles.	135
3.4.3.1.1 Parámetros que afectan el índice de migración.	135
3.4.3.2 Tipos de agarosa.	136

3.4.3.3 Geles de poliacrilamida: rango efectivo de separación para DNA.	137
3.4.3.4 Buffers para electroforesis.	137
3.4.4 Condiciones para la electroforesis.	138
3.4.4.1 Agarosa	138
3.4.5 Detección de fragmentos de DNA.	138
3.4.5.1 Tinción de Bromuro de etidio.	138
3.4.5.2 Hibridación molecular.	139
3.4.6 Determinación de Peso Molecular.	139
3.4.7 Aislamiento de fragmentos de DNA de agarosa.	139
3.4.7.1 Electroelución.	139
3.4.7.2 Recuperación de DNA a partir de geles de agarosa de bajo P.F.	140
3.4.7.6 Método de adherencia "Glass Max"	140
3.4.7.4 Electroforesis en membrana de celulosa DEAE.	140
3.4.8 Aislamiento de fragmentos de DNA de poliacrilamida.	141
3.4.8.1 Método "Curz and Soak"	141
3.4.8.2 Electroelución.	141
3.4.8.3 Electroforesis en membrana de celulosa DEAE.	141
3.5 Hibridación de Ácidos Nucleicos	142
3.5.1 Características importantes.	142
3.5.2 Clasificación de las Técnicas de Hibridación.	143
3.5.4 Electroforesis en Gel.	144
3.5.4.1 Preparación de la muestra.	145
3.5.5 Transferencia a un soporte sólido.	146
3.5.6 Preparación de la sonda.	147
3.5.7 Hibridación	148
3.5.8 Lavado.	148
3.5.9 Detección de los híbridos.	148
3.5.9.1 Autoradiografía	148
3.6 Clonación	150
3.6.1 Características de un vector de clonación.	150
3.6.2 Tipos de vectores.	150
3.6.3 Plásmidos.	150
3.6.3.1 Algunas consideraciones importantes al trabajar con plásmidos.	153
3.6.3.2 Estrategias de clonación para reducir el efecto de "fondo".	153
3.6.3.3 Otras técnicas de clonación para plásmidos y otros vectores.	157
3.6.4 Vectores Fágicos.	161
3.6.5 Cósmidos	161
3.6.6 Cromosomas artificiales.	161
3.6.6.1 El Cromosoma Artificial de Levadura (YAC).	161
3.6.6.2 El Cromosoma Artificial Bacteriano (BAC).	164
3.6.7 Las Genotecas.	164
3.6.8 Inserción de Genes en células eucariotas.	170

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

3.6.8.1 Preparación de células para transformación.	170
3.6.8.2 Eficiencia de transformación.	170
Capítulo IV. Otras técnicas utilizadas en la Ingeniería Genética.	172
4.1 Reacción en Cadena de la Polimerasa.	172
4.2 Cariotipificación Espectral.	174
4.3 Microdissección Cromosomal.	175
4.4 El Chip de DNA.	176
4.5 Tecnología de Microarreglo de DNA.	177
Conclusión	178
Lista de Abreviaturas	180
Bibliografía	182

OBJETIVO GENERAL

Elaborar un documento que permita a los alumnos de la carrera de QFB contar con información útil y concreta sobre el DNA recombinante, las técnicas de Biología Molecular implicadas en su desarrollo y las aplicaciones prácticas que puede tener en beneficio del hombre y su entorno.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Realizar un estudio teórico sobre los inicios de la Genética y su desarrollo a lo largo de la historia, con la finalidad de establecer que los Ac. Nucleicos son la base de la herencia.
2. Establecer las propiedades fisicoquímicas y naturaleza de los Ac. Nucleicos con el propósito de comprender su comportamiento.
3. Teniendo en cuenta las funciones bioquímicas de los Ac. Nucleicos y su importancia en el ciclo celular, comprender que son el sostén del dogma central de la Biología Molecular.
4. Realizar una revisión teórica documentada en fuentes recientes sobre las técnicas de Biología Molecular y sus aplicaciones en la Ingeniería Genética para la creación de DNA recombinante.

INTRODUCCIÓN

El estudio de la Genética ha estado siempre presente en el pensamiento humano y podríamos remontarlo a aquel pasaje bíblico "Hágase la luz" o "Creced y multiplicaos"⁵⁴. En su discurso del 26 de Junio de 2000 con motivo de la celebración por la primera fase del Proyecto Genoma Humano, el Presidente Clinton llamó al mapa genético "El lenguaje de Dios". Para aquellos con inclinaciones menos religiosas la Genética es ciertamente el lenguaje de la naturaleza y de los seres vivos²⁵.

El siglo XX fue testigo de una serie impresionante de descubrimientos en las ciencias biológicas, en particular en el área de Biología Molecular; la disciplina científica que busca entender completamente las bases moleculares de la herencia, variación genética y los patrones de expresión de unidades individuales de la herencia llamadas genes²⁴.

Los organismos se generan a partir de la información codificada en un conjunto de genes. El programa genético humano contiene suficiente información, si se convirtiera a palabras, para llenar millones de páginas de texto. Lo más sorprendente es que esta vasta cantidad de información se encuentra empacada en un conjunto de cromosomas que ocupa el espacio de un núcleo celular, miles de veces más pequeño que el punto sobre esta letra *i*.

Los genes son algo más que gavetas para almacenar información; constituyen las plantillas para construir estructuras celulares, y contienen instrucciones para poner en marcha las actividades de la célula y el programa para reproducirse a sí mismas. Descubrir los mecanismos mediante los cuales las células emplean su información genética para efectuar estas funciones es uno de los más grandes logros de la ciencia en los últimos años⁵⁸.

Los genes tienen influencia no sólo en la manera en qué nos vemos sino también en qué enfermedades podemos, eventualmente, llegar a padecer⁵⁵.

La mayoría de la gente ve a la Ingeniería Genética como un alcance científico relativamente nuevo; por ejemplo, Dolly fue el primer mamífero clonado a partir de una célula de un animal adulto en 1996⁴⁷; pero de hecho, todas las técnicas utilizadas actualmente son el resultado de una serie de descubrimientos que se han sucedido en un periodo de más de 125 años²⁴. Dichas técnicas nos han llevado al conocimiento de la relación entre genes y proteínas; dada la importancia de éstas últimas para el buen funcionamiento de células, órganos y sistemas en cualquier ser vivo, es vital conocer la expresión de los genes que regulan la síntesis de alguna proteína de interés. Por ejemplo, el cáncer es una enfermedad producida por cambios en la conducta de las células provocados por modificaciones en la información genética subyacentes de las mismas y por consiguiente en las proteínas resultantes de dicha expresión⁵⁸. Únicamente las herramientas proporcionadas por la Biología Molecular y la Ing. Genética pueden aislar y estudiar estos genes defectuosos y quizás no estemos lejos de una cura para esta terrible enfermedad.

En 1979, un joven llamado David captó la atención de la sociedad estadounidense como "*El niño de la burbuja de plástico*", nació con un padecimiento hereditario muy raro llamado Enfermedad por Inmunodeficiencia Combinada Grave (EICG), en el 25% de los casos se debe a la ausencia de la enzima Adenosina Desaminasa (ADA), que cataliza una reacción en la vía de degradación de las purinas. Sin esta enzima, el estrato se acumula y en concentraciones tóxicas mata a ciertas células sensibles, incluyendo a linfocitos T. Fue hasta 1990 cuando una niña de cuatro años afectada por esta enfermedad fue la primera persona autorizada por los National Institutes of Health y la Food and Drug Administration de Estados Unidos para recibir generterapia. En Septiembre de 1990 se le administró una transfusión de sus propios

leucocitos portadores de copias normales del gen ADA gracias a modificaciones genéticas. Los resultados de esta primera aventura de la geneterapia indican que el tratamiento tuvo éxito ⁵⁸.

Pero no sólo en Medicina es que la Ing. Genética puede ayudar al hombre, también en la industria alimenticia ha sembrado semillas de nuevas tecnologías, como el primer tomate modificado genéticamente, producido en 1994 y el cual carece de la enzima poligalacturonasa (PG) que es responsable del reblandecimiento prematuro, confiando así una vida de anaquel mayor a estos tomates.²⁹

Los grandes avances científicos que estas tecnologías han proporcionado han ayudado a colocar en las manos de muchas mentes brillantes el Premio Nóbel de Fisiología y Medicina, Química u otros, ya sean creadores o científicos que aplicaron alguna técnica previamente desarrollada ^{21,50,51}. Aunque algunos no vivieron para ver el éxito de su esfuerzo. Mendel por ejemplo, no fue reconocido en vida, ni siquiera se enteró que fue nombrado "El padre de la Genética", fue Thomas Hunt Morgan el que redescubrió los principios mendelianos y a él si le creyó la comunidad científica ⁵³. Pareciera que el avance y el progreso exigen numerosas víctimas en sacrificio de los beneficios que traerá y numerosas son las tumbas sin nombre en el campo de la biología celular y posteriormente en la genética. El capítulo uno está encaminado no sólo a desarrollar una revisión cronológica de los descubrimientos en este campo sino como un reconocimiento a todos ellos.

Posteriormente en el capítulo dos se fundamentan las características de los ácidos nucleicos y los mecanismos por los cuales llevan a cabo la importante tarea del dogma central de la Biología Molecular. Una vez desarrollado esto llegamos al capítulo tres con la aplicación de estos conceptos en técnicas experimentales que están al servicio de la genética.

Los ilimitados alcances de esta nueva ciencia llevan a la comunidad científica y civil preguntarse ¿Hasta dónde llegar? Es en este rubro que la bioética surge como un nuevo código que regule las prácticas genéticas dentro de los límites del respeto por la naturaleza. Bien sabido es la serie de experimentos genéticos que llevaron a cabo los nazis con gemelos judíos durante los años del holocausto ⁵⁶. Además de las consecuencias genéticas de un arma biológica o de una bomba atómica. Es por eso que debemos asegurarnos como estudiantes y posteriormente como profesionistas que los beneficios que estas técnicas traigan a la humanidad sean mayores que las consecuencias negativas que puedan tener.

En algunos Institutos de Salud Mental se aplican las modernas técnicas de Biología Molecular para estudiar las regiones cromosómicas de hermanos consanguíneos homosexuales para localizar uno o varios genes que permitan concluir que una determinada persona desarrollará cierta tendencia sexual. ⁵⁷

Aunque son muchas las personas que piensan que debe haber límites para el uso de estas tecnologías la verdad es diferente. En Inglaterra existe un nuevo tipo de joyería diseñada en base al patrón de DNA de la persona interesada. De esta manera, se están elaborando obsequios muy personales y en toda clase de materiales de acuerdo a las posibilidades económicas del cliente. ¹²²

Los alumnos de la carrera de QFB tienen acceso a la información teórica sobre estas técnicas gracias al amplio acervo con que cuentan la biblioteca y la hemeroteca, no así en la práctica ya que carecemos de recursos para poder aprender y adquirir práctica y experiencia en las más recientes debido al alto costo de los equipos. No obstante el esfuerzo de muchos profesores hace posible la implementación de técnicas de Biología Molecular básicas en los laboratorios de varias asignaturas. Es por eso que la realización de esta tesis va encaminada a colaborar en ese esfuerzo conjunto para proporcionar a los alumnos un apoyo en esta nueva ciencia que será la base de muchos logros para el hombre en el recién estrenado Siglo XXI.

CAPÍTULO 1. HISTORIA DE LA BIOLOGÍA MOLECULAR Y GENÉTICA.

922 – 585 a.C

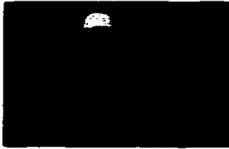


Fig 1⁽¹³⁴⁾

Uno de los primeros registros que se relaciona a la genética es la descripción del ritual de circuncisión encontrado en el Talmud, así como en la Biblia. En ellos se notaba que ciertos niños no podían ser circuncidados a pesar de que la doctrina religiosa lo demandaba. Tal vez estos hebreos reconocieron el desorden genético conocido ahora como hemofilia²⁴.

470 – 322 a.C



Fig. 2⁽¹³⁵⁾

Los filósofos griegos Hipócrates, Aristóteles y Platón escribieron acerca de la herencia. Ellos observaron que ciertos caracteres son dominantes y que pasan de padres a hijos. Estos primeros filósofos creían que el semen es de algún modo responsable de la transmisión de estas características, aunque no entendían la contribución exacta del padre o la madre a los descendientes. Platón parece entender que los humanos que tienden a unirse con otros humanos de características similares producen descendientes que tienen menos capacidad de enfrentar "los retos de la vida"^{41,24}.

1745



Fig. 3⁽¹³⁶⁾

Maupertuis establece la teoría de la adaptación aplicada al diseño orgánico²².

Pierre – Louis Moreau de Maupertuis (1698 – 1759).- Fue un físico francés mejor conocido por su trabajo en esta área. Sin embargo realizó un trabajo sobre la evolución llamado "Système de la nature" (1751) el cual contiene especulaciones teóricas sobre la naturaleza de la herencia basadas en un estudio de una familia de Berlín la cual presentaba polidactilia en varias generaciones. Maupertuis demostró que esta conformación puede ser transmitida tanto por el padre o la madre y explicó que esta característica es el resultado de una mutación en las partículas hereditarias. También estimó la probabilidad matemática de aparición en nuevos miembros de la familia.²³

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Fig. 4 (137)

1859

Darwin publica "El origen de las especies", estableciendo que la evolución genética permite la adaptación de las especies con el paso del tiempo, para producir organismos mejor adaptados al medio ambiente¹.

Charles Darwin era hijo y nieto de médicos. Se embarcó en el *Beagle* como naturalista de la expedición del capitán Fitzroy en 1831. Durante 5 años recorrieron América del Sur y las islas del Pacífico y el joven Darwin fue recogiendo observaciones sobre las cuales basaría toda su posterior obra de investigación. En su libro: "El Origen de las Especies" explica una nueva teoría de la evolución llamada *Darwinismo* que establece, entre muchos conceptos que "Una diferencia inferior a un grano en la balanza puede determinar qué individuos han de vivir y cuáles perecerán"².



Fig. 5 (138)

1865

Gregory Mendel establece que las características de un individuo se encuentran en unidades llamadas factores. Postula una serie de reglas que gobiernan la herencia²⁸.

Mendel publicó los resultados de experimentos de cruce efectuados en la planta del guisante *Pisum sativum*. Notando la aparición o ausencia de características, tales como el color de la flor o la textura del guisante (liso o rugoso) en varias generaciones, Mendel fue capaz de postular sus leyes de la herencia²⁷.

Fig. 6 (139)

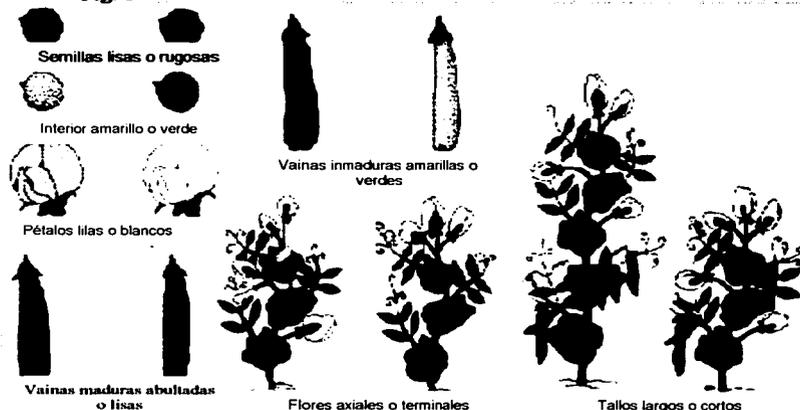




Fig. 7⁽¹⁴⁰⁾

1869

Miescher descubre la "nucleína" (DNA) en células de pus en heridas abiertas. Se sospecha que esta sustancia ejerce alguna función en el proceso hereditario²².

Johann Friedrich Miescher (1844 – 1895).- Fue médico militar. Observó las células contenidas en el pus de los vendajes que se retiraban de los heridos de la Guerra de Crimea (Península localizada en la antigua U.R.S.S. ²³) y descubrió que estaban compuestas principalmente de material nuclear. Posteriormente observó lo mismo en espermatozoides de salmón. Esta sustancia contenida en el núcleo se conoció como Ácido nucleico después de 1874 cuando Miescher la separó en una proteína y una molécula de ácido²⁴.



Fig. 8⁽¹⁴¹⁾

1872

Walter Flemming dibujó por primera vez la formación y movimiento de los cromosomas durante la división celular, describió el proceso de Mitosis²¹.

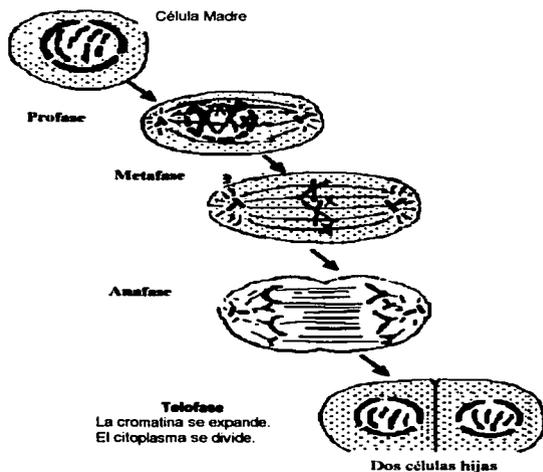


Fig. 9⁽¹⁴²⁾

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Fig. 10⁽¹⁴³⁾

1900

Hugo Marie de Vries (1848 – 1935).- Descubrió y verificó los principios de Mendel de manera independiente, marcando el inicio de la genética moderna²¹.

Profesor de botánica de la Universidad de Amsterdam, realizó el mismo descubrimiento que Mendel y le dio a éste todo el crédito. Sin embargo, añadió su propio concepto de herencia en el cual propone que unidades llamadas "pangenes" son los portadores de las características hereditarias. Del mismo modo que los "factores" de Mendel, los pangenes fueron definidos como unidades discretas e independientes²².



Fig. 11 Walter Sutton⁽¹⁴⁴⁾

1902

Walter Sutton y Theodor Boveri de manera independiente llegaron al mismo descubrimiento. Son autores de la teoría cromosomal Boveri-Sutton que fue discutida y debatida durante los primeros años del siglo XX⁴⁷.

Boveri había demostrado previamente que el óvulo y el espermatozoide contribuyen cada uno con el mismo número de cromosomas. Sus experimentos los realizó con orizos de mar. Estos huevos pueden ser fertilizados con dos espermatozoides. Boveri demostró que las células hijas de estas dobles uniones poseen un número variable de cromosomas. De los embriones resultantes sólo un pequeño porcentaje poseen el juego completo de 36 cromosomas y por lo tanto se desarrollarían normalmente. La conclusión fue "una selección específica de cromosomas es responsable de un desarrollo normal". Y esto significa que los cromosomas individuales poseen cualidades diferentes².

Sutton trabajó con especies marinas y se familiarizó con el proceso de "reducción-división" (posteriormente llamado meiosis), que origina células reproductoras y el número de cromosomas se reduce a la mitad. En 1902 sugirió que la asociación de cromosomas paternos y maternos en pares y su subsecuente separación durante el proceso de reducción-división puede constituir la base física de la Ley Mendeliana de la herencia²³.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1905



Fig. 12⁽¹⁴⁵⁾

Nettie Stevens fue una de las primeras mujeres científicas que dejó un legado en la ciencia. Fue discípula de Thomas Hunt Morgan y Theodor Boveri. Describió el comportamiento de los cromosomas sexuales a partir de sus estudios en gusanos y otros insectos y determinó que XX = hembra, XY = macho. Otro investigador: Edmund Wilson llegó a la misma conclusión de manera independiente^{21,30}.

1908



Fig. 13⁽¹⁴⁶⁾

Archibald Garrod (1857 – 1936).- Postula que los defectos genéticos causan muchas enfermedades hereditarias. Algunas de éstas son debidas a “errores innatos del metabolismo” que resultan de la falta de una enzima específica³¹.

Garrod se interesó en pacientes con un raro pero inofensivo desorden conocido como Alcaptonuria en el que la orina del paciente se torna de color negro cuando es expuesta al aire. Este mal es poco común pero muy frecuente en niños nacidos de matrimonios entre primos hermanos. En base a esta teoría Garrod formuló el concepto de “Errores innatos del metabolismo” y concluyó que dos individuos eran más diferentes de manera química que de manera estructural¹⁷.

1910



Fig. 14⁽¹⁴⁷⁾

Thomas Hunt Morgan propuso una teoría de herencia ligada al sexo para la primera mutación descubierta en la mosca de fruta. Esta fue seguida por la teoría del gen, incluyendo el principio del ligamiento²¹.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Morgan reprodujo durante dos años a la mosca de fruta *Drosophila melanogaster* hasta que en 1910 nació una mosca macho con ojos blancos en lugar de los ojos rojos normales. Posteriormente siguió el procedimiento utilizado por Mendel y las proposiciones de mutación se presentaron de acuerdo a las leyes mendelianas, pero observó que sólo los machos presentaban esta anomalía. De sus trabajos concluyó que: 1) los genes residen en cromosomas, 2) cada gen debe residir en un cromosoma en particular y 3) que la característica para el color de los ojos debe residir en el cromosoma sexual, situado en el cromosoma Y; por lo tanto siendo dominante en el cromosoma X²⁰.



Drosophila melanogaster

Fig. 15²⁰



Fig. 16⁽¹⁴⁾

1913

Alfred H. Sturtevant (1891 – 1970).- construye el primer mapa genético. Fue estudiante de Morgan y colaboró con él en los experimentos realizados con *Drosophila*. Su colaboración fue una piedra angular en la teoría cromosomal y ayudó a establecer las aproximaciones que hicieron exitosos a los chicos mosca del laboratorio. También hizo importantes observaciones de la meiosis⁴⁰.



Fig. 17⁽¹⁵⁾

1918

Herbert M. Evans determina que las células humanas contienen 48 cromosomas, desafortunadamente para él estaba equivocado; el número correcto es 46 cromosomas¹³.



Cromosomas

Fig. 18⁽¹⁵⁾

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1920's (inicio)

Se descubre que el ácido nucleico es el mayor componente de los cromosomas. Se pensaba que su estructura molecular era demasiado simple y que no era un buen candidato para portar la información genética²².



Fig. 19 (152)

1926

Hermann J. Muller formula los principios de la mutación espontánea de genes concluyendo que el gen constituye la base de la vida y la evolución al reproducir sus propios cambios internos. Además el daño genético no puede ser reparado y se transmite de generación en generación¹³.

Muller estudió el proceso y frecuencia de las mutaciones, lo que le permitió desarrollar un esquema del armado y combinaciones de los genes. Estos hallazgos le permitieron detectar la inducción de mutaciones genéticas con los rayos X. Recibió el Premio Nóbel de Fisiología y Medicina en 1946. Fue un activo promotor en las campañas sobre el peligro de las radiaciones en las futuras generaciones²⁹.



Fig. 20 (153)

1927

Bernard Ogilvie Dodge inicia sus trabajos con *Neurospora*. Estos conducirán a un entendimiento fundamental de la bioquímica genética. Estableció la naturaleza Mendeliana de la herencia en tres especies: *Neurospora crassa*, *N. sitophila* y *N. tetrapersma*¹³.

En el tiempo que el Dr. Dodge hizo sus primeras contribuciones a la genética de los hongos nadie lo creyó (de hecho, la mayoría de los científicos no lo creyeron), que los hongos obedecieran las mismas leyes de la herencia que eran efectivas para plantas y animales superiores. Él convenció al público científico de la validez de la Teoría Genética mendeliana para los hongos²⁷.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1928

Griffith descubrió el proceso de transformación, un proceso que involucra la absorción de material genético por un organismo vivo.

Fred Griffith inyectó ratones con una mezcla de *Streptococcus pneumoniae* tipo I, vivo, no virulento con *S. pneumoniae* tipo II, virulento. Observó que esta mezcla conducía a la muerte de los ratones. La cepa tipo II, viva y virulenta fue recuperada de los ratones muertos, implicando que la información genética de la cepa virulenta había sido transferida de alguna manera a la cepa no virulenta.²⁰

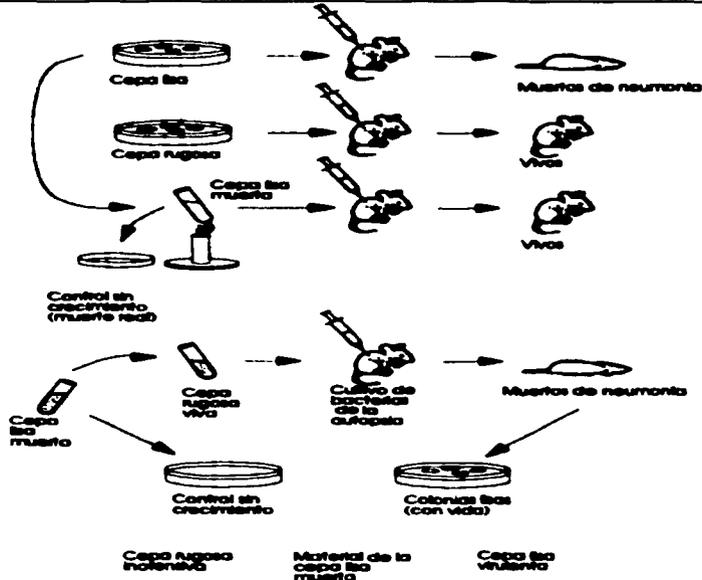


Fig. 21⁽¹⁵⁴⁾

1930's

Se investiga la estructura del ácido nucleico, se pensaba que era un tetranucleótido compuesto de una unidad de cada uno de los ácidos: adenilico, guanilico, timidilico y citidilico²².

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1935



Fig. 22 ⁽¹⁵⁸⁾

Andrei Nikolaevitch Belozersky aísla el DNA en estado puro por primera vez ¹³.

1940's (inicio)

Se encontró que el peso molecular era mucho mayor que el que correspondía a la hipótesis del tetranucleótido. Se pensaba que la información hereditaria residía en las proteínas del cromosoma ya que estas son diferentes entre especie e individuos ²².



Fig. 23 George Beadle ⁽¹⁵⁶⁾

1941

George Beadle y Edward Tatum, Sus experimentos en el hongo *Neurospora crassa* los llevaron al concepto "un gen – una enzima" ¹³.

Beadle y Tatum seleccionaron como objeto para sus investigaciones un organismo de estructura muy simple: *Neurospora crassa*. Cuando los cultivos son expuestos a radiación con rayos X, se producen mutaciones. Al producir un gran número de mutaciones y por medio del análisis del material Beadle y Tatum demostraron que las sustancias son sintetizadas en la célula, de manera individual y paso a paso en cadenas enormes de reacciones químicas; y que los genes controlan estos procesos al regular individualmente los pasos en la cadena de síntesis. Esta regulación se lleva acabo por la formación de enzimas especiales a través de genes. Si el gen se daña, por ejemplo, a través de radiación por rayos X, la cadena se rompe, la célula se vuelve defectuosa y muy posiblemente no sobrevivirá. Por este trabajo obtuvieron el Premio Nóbel de Fisiología y Medicina en 1958 ²⁴.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1942



Luria y Delbruck demostraron que las alteraciones mutacionales ocurren al azar y antes de la exposición a influencias mutagénicas externas; y que la herencia en la bacteria está sujeta a la selección natural. Son los iniciadores de la genética bacteriana^{39, 41}.

Fig. 24 Delbruck⁽¹⁵⁷⁾

Delbruck y Luria colaboraron en experimentos de fagos. En 1943 publicaron un artículo describiendo la "prueba de fluctuación". Esta demostró que las bacterias podían mutar espontáneamente en respuesta al fago y de ese modo desarrollar resistencia a éstos. Se les otorgó el Premio Nóbel de Fisiología y Medicina en 1969²².

1944



Fig. 25⁽¹⁵⁸⁾

Oswald Avery Identifica al Ácido Nucleico como el principio activo en la transformación bacteriana²².

Basado en los trabajos de Griffith, Avery y sus colegas McCarty y McCleod demostraron que la transferencia de DNA es responsable por la transformación de *Streptococcus pneumoniae* de un fenotipo no virulento a un fenotipo virulento²².

1947



Fig. 26⁽¹⁵⁹⁾

Bárbara McClintock publica pruebas de elementos genéticos móviles en el maíz (transposones), pero su trabajo no fue reconocido en ese momento²⁸.

McClintock trabajó con cepas de maíz irradiado en las que descubrió que los cromosomas se rompían por efecto de la radiación. Los extremos de los cromosomas a veces se fusionaban con otros y formaban un anillo. Esto llevó a la hipótesis de una estructura especial en la punta del cromosoma que McClintock llamó "Telómero", y que le da estabilidad al cromosoma. Fue en estas cepas de maíz que observó un comportamiento genético extraño. Ciertas genes mutables parecían ser transferidos de célula a célula durante el desarrollo del maíz. Bárbara diría más tarde "una célula gana lo que la otra pierde" Recibió el Premio Nóbel de Fisiología y Medicina en 1983^{28, 30}.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1950



Fig. 27⁽¹⁶⁰⁾

Erwin Chargaff demuestra que los 4 nucleótidos no están presentes en los ácidos nucleicos en proporciones estables y que la composición del nucleótido difiere de acuerdo a su origen biológico²².

Chargaff examinó el DNA utilizando las técnicas de Cromatografía en papel y espectroscopía ultravioleta recientemente desarrolladas en su tiempo, y encontró que la composición del DNA era constante para una misma especie pero difería grandemente entre especies diferentes. Esto lo llevó a concluir que debe haber tipos diferentes de DNA como especies distintas. Posteriormente Chargaff descubrió que el número de bases púricas (adenina y guanina) era siempre igual al número de bases pirimídicas (citosina y timina) y que el número de bases adenina es igual al número de bases timina; así como el número de bases guanina es igual al número de bases citosina. Esta información fue crucial para el trabajo que realizaron Watson y Crick posteriormente²³.

1952



Fig. 28⁽¹⁶¹⁾

Alfred Hershey y Martha Chase observan que en la infección de una bacteria por un virus, al menos 80% del DNA viral entra a la célula y al menos 80% de la proteína viral permanece afuera; por lo tanto es el DNA el que porta la información genética y no la proteína²².

En el experimento utilizan 2 isótopos radioactivos: P³² y S³⁵. Hershey usó un isótopo a la proteína viral y otro al DNA viral. Después dejó que el fago marcado empezara a infectar una colonia bacteriana. En el proceso de infección, el fago se pega en la pared bacteriana e inyecta su material genético en la célula huésped. Posteriormente se introduce la célula en un mezclador, el cual produce la fuerza necesaria para sacar las fagos de la pared bacteriana sin romper ésta. Después de exponer a las bacterias Hershey encontró que sólo el DNA del fago había sido inyectado, no había proteínas detectables. Estos resultados confirman las hipótesis de Avery y pertenecen a la comunidad científica porque las genes están hechos de DNA²³.

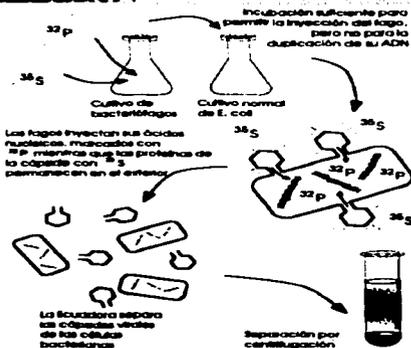


Fig. 28⁽¹⁶¹⁾

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

1953



Fig. 30⁽¹⁶³⁾

Watson y Crick determinan que el ácido desoxiribonucleico (DNA) es una hélice de nucleótidos de doble cadena. La replicación del DNA es posible a través de la naturaleza complementaria de las dos cadenas. Se piensa que la complejidad química de la molécula es suficiente para almacenar la información requerida. En esta época aún no se entiende la manera en la cual la información del DNA es activada para construir un organismo ⁴⁷.

1954



Fig. 31⁽³⁹⁾

Fred Sanger desarrolló el método de terminación de cadena para secuenciar DNA. Sanger creó un nuevo método de cromatografía para determinar grupos terminales y sus resultados sobre los grupos amino libres de la insulina fueron publicados en 1945. Explotando las técnicas determinó posteriormente las secuencias N-terminales de las dos cadenas de insulina en 1949. La secuencia completa de insulina fue publicada en 1955 y Sanger recibió el Premio Nóbel de Química en 1958 ¹⁶.



Fig. 32 Gamov ⁽¹⁶⁴⁾

1957

Francis Crick y George Gamov resolvieron el "Dogma Central", explicando como funciona el DNA para hacer una proteína. Su hipótesis postula que la secuencia de DNA especifica la secuencia de aminoácido en la proteína ⁴¹.

Gamov y Crick sugirieron que la información genética fluye en una dirección: DNA → RNA → Proteína, este es el concepto fundamental del dogma central. El primer esquema de codificación inspirado por la estructura de Watson - Crick provino de un inesperado autor que no era biólogo o químico; sino un físico: George Gamov, quien propuso la teoría del big bang en cosmología ⁴².

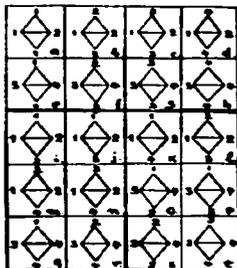


Fig. 33. Código de Gamov y Crick ⁽⁴³⁾



Fig. 34 ⁽¹⁶⁵⁾

1958

Arthur Kornberg descubrió y aisló la DNA polimerasa. Decidió enfocar su investigación en bioquímica y en particular en enzimas. Pasó décadas aislando y purificando las enzimas que hacen trabajar la maquinaria de la célula. Él y Severo Ochoa fueron los primeros en identificar la enzima que cataliza la síntesis de DNA: Polimerasa I. En reconocimiento a su trabajo elucidando los mecanismos básicos de replicación del DNA fueron galardonados con el Premio Nóbel en Fisiología y Medicina en 1959 ².

1959

Sawada et al. Demostraron que la resistencia a antibióticos puede ser transferida entre cepas de *Shigella* y *E.coli* por plásmidos extracromosomales y que ésta transferencia no involucra ni transformación ni transducción ²⁸.



1960

Jacob, Pardee y Monod demostraron la inducibilidad de la enzima bacteriana β -galactosidasa alterando las condiciones de cultivo. Esta observación condujo a otros experimentos que elucidaron los mecanismos que involucran el control regulador de la expresión génica ²⁸.

Fig. 35 Francois Jacob ⁽¹⁶⁶⁾

Francois Jacob y Jacques Monod estudiaron los mecanismos responsables de la transferencia de información genética, así como de las vías reguladoras, las cuales en la célula bacteriana ajustan la actividad y síntesis de macromoléculas. Siguiendo este análisis Jacob y Monod propusieron una serie de nuevos conceptos como RNA mensajero, genes reguladores, operones y proteínas alostéricas. Se les otorgó el Premio Nóbel en Fisiología y Medicina en 1965 ⁴⁰.

1961

May y Speigleman establecieron las bases para el desarrollo de la hibridización DNA-DNA y DNA-RNA; métodos que se convirtieron en la piedra angular de la Biología molecular moderna ²⁸.

Crick, Brenner y colegas propusieron la existencia de un RNA de transferencia que utiliza un código de 3 bases y participa directamente en la síntesis de proteínas, más tarde demostraron que los ribosomas son el sitio de síntesis de proteínas ²⁸.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1964



Fig. 36⁽¹⁴⁷⁾

Nirenberg, Ochoa y Khorana elucidaron el código genético ¹³.

Marshall Nirenberg elucidó el código genético, en donde la secuencia de 3 bases de nucleótidos (codón) determina cada uno de los aminoácidos. Nirenberg empezó a colaborar con el alemán Johann Matthaei. Prepararon un extracto a partir de células bacterianas que podían hacer proteínas sin cuando no estuvieran presentes células vivas. Añadiendo una forma artificial de RNA: ácido polirribotico a este extracto se ocasionó la producción de una proteína no natural compuesta enteramente del aminoácido fenilalanina. Esto proporcionó la primera clave para descifrar el código a través del cual el RNA y DNA controlan la producción de tipos específicos de proteínas en la célula viva. Para 1964, con ayuda de nuevas técnicas de decodificación se descifró el código completo en un año ^{24, 25, 26}. Recibió el Premio Nóbel en 1968.

1967



Fig. 37⁽¹⁴⁸⁾

Waclaw Szybalski y William Summers demostraron que una sola hebra actúa como plantilla para la transcripción de RNA a partir de una plantilla de DNA. Utilizaron el bacteriófago T7 para demostrar que únicamente una hebra de DNA actúa como plantilla para la síntesis de RNA. Utilizaron la técnica de hibridización DNA - RNA para alinear el RNA recién sintetizado con la hebra original de DNA ³⁸.

1970



Fig. 38 David Baltimore⁽¹⁴⁹⁾

Baltimore y Temin de manera independiente reportaron el descubrimiento de transcriptasa reversa en virus RNA. Lo que demostró la posibilidad de un flujo de información genética de RNA a DNA ²⁸.

David Baltimore demostró la presencia de una enzima específica en partículas virales RNA de tumores, las cuales podían hacer una copia de DNA a partir de RNA. Esta enzima fue llamada transcriptasa reversa. La prueba final de la presencia de virus RNA en forma de una copia de DNA integrada dentro del material genético de las células transformadas fue proporcionada por otros experimentos que demostraron que el DNA purificado de una célula transformada, al ser introducido a una célula normal ocasiona la producción de nuevas partículas virales RNA. Junto con Renato Dulbecco, Baltimore y Temin recibieron el Premio Nóbel de Fisiología y Medicina en 1975 ²⁹.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Fig. 39⁽¹⁷⁹⁾

Hamilton Smith aisló la primera enzima de restricción, Hind II, que podía cortar moléculas de DNA dentro de sitios de reconocimiento específico ²⁸.

Werner Arber descubrió las enzimas de restricción. Smith verificó la hipótesis de éste con una enzima de restricción bacteriana purificada y demostró que esta enzima corta al DNA a la mitad de una secuencia asimétrica específica. Otras enzimas de restricción tienen propiedades similares, pero enzimas diferentes reconocen secuencias diferentes. Finalmente, Dan Nathans fue el pionero en la aplicación de las enzimas de restricción en genética, demostró su uso para la construcción de mapas genéticos y otras metodologías igualmente importantes en este campo. Por todo lo anterior, los tres fueron galardonados con el Premio Nóbel de Fisiología y Medicina en 1978 ²⁸.

1972

Mertz y Davis confirmaron que la secuencia de DNA que es cortada por una enzima de restricción es complementaria a otra secuencia de DNA cortada por la misma enzima. Esta observación abrió el camino para la unión de secuencias no similares y otras formas de Ingeniería Genética ²⁸.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Fig. 40⁽¹⁷¹⁾

Paul Berg reportó la construcción de una molécula de DNA recombinante formada de secuencias de DNA bacteriano y viral ²⁸.

Berg fue el primero en construir una molécula que contenía partes de DNA de diferentes especies. Su experimento innovador fue el resultado de una tecnología nueva llamada Ingeniería Genética o manipulación genética. Se le otorgó el Premio Nóbel de Química en 1980 ²⁸.



1973

Cohen, Chang, Helling y Boyer demostraron que los plásmidos pueden actuar como vectores para la propagación de genes extraños clonados ²⁸.

Fig. 41 Stanley Cohen ⁽¹⁷²⁾

Stanley Cohen y sus colaboradores transfirieron exitosamente DNA de una forma de vida a otra, creando el primer organismo DNA recombinante. Separaron partes de DNA viral y de DNA bacteriano para crear un plásmido ²⁸.

1975

Southern describió una nueva herramienta analítica: Southern Blotting, que permite a los investigadores determinar un mapa físico de sitios de restricción dentro de un gen en su posición cromosomal normal y un estimado del número de copias de un gen en el genoma ²⁸.

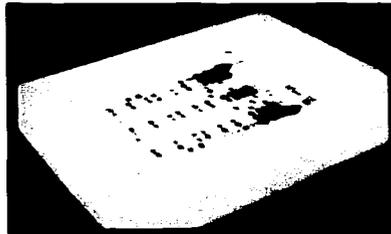


Fig. 42. Técnica de Southern Blotting ⁽¹⁷³⁾

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Se convocó una moratoria sobre experimentos de DNA recombinante en la cual se adoptaron reglas para regular los experimentos con DNA recombinante ¹³.

1976

Herbert Boyer y Robert Swanson fundaron Genentech, Inc., la primera compañía de Biotecnología dedicada a desarrollar y comercializar productos de tecnología de Ingeniería Genética¹³.



Fig. 43. Genentech, Inc. (174)

1977

Chow y Roberts, Sharp (de manera independiente) demostraron la existencia de los intrones²⁸.

Nester, Gordon y Dell-Chilton prepararon el camino para la Ingeniería Genética en especies de plantas.

Este año puede ser llamado “El amanecer de la Biotecnología”, cuando un gen hecho por el hombre fue utilizado para fabricar una proteína humana en bacterias por primera vez –somatostatina¹³.

16 Iniciativas de Ley fueron introducidas al Congreso de los Estados Unidos de América para regular las investigaciones con DNA. Ninguna fue aprobada.

1978

Genentech, Inc. y el Centro Médico Nacional “The City of Hope” anunciaron la producción exitosa de insulina humana utilizando tecnología recombinante. Fue comercializada en 1982 por Eli Lilly Internacional Corp. Como “Humulina”¹³.



Fig. 44(175)

David Botstein y Colaboradores encontraron que cuando utilizaban enzimas de restricción de diferentes individuos, los fragmentos resultantes eran frecuentemente diferentes de una persona a otra. Las variaciones fueron llamadas Polimorfismos de Longitud de fragmentos de Restricción y éstos eventualmente conducirían al mapeo del DNA¹³.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

1980

Los kits de Biología Molecular están disponibles comercialmente y la industria de la biotecnología empieza a florecer ²⁸.



Fig. 45 ⁽¹⁷⁶⁾

1981

Eli Lilly recibe la aprobación de la FDA (Food and Drug Administration) para introducir al mercado la primera proteína recombinante: insulina humana, para el tratamiento de diabetes ²⁹.

En la Universidad de Ohio se crean los primeros animales transgénicos, ratones con genes transferidos de otros animales, existen ratas, conejos, cerdos, borregos, vacas y peces aunque el 95% de todos los animales transgénicos existentes son ratones ⁴⁵.



Fig. 46 Animales Transgénicos ⁽¹⁷⁷⁾



Fig. 47 ⁽¹⁷⁸⁾

1983

Kary Mullis inventa la PCR. Este invento revolucionaria de Nuevo el área de biotecnología y haría el proyecto Genoma Humano Posible ¹³.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Mullis utilizó una enzima DNA polimerasa del organismo *Thermus aquaticus* (estable al calor) para replicar DNAs específicos de interés utilizando iniciadores (primers) en cada lado del gen que iba a ser amplificado. Los primers se alinearon a sus secuencias homólogas y la reacción se repite con el objetivo de amplificar el DNA blanco exponencialmente. Esta técnica revolucionó la biología moderna y Mullis fue galardonado con el Premio Nóbel de Química en 1993 ²⁰.

Syntex Corporation recibe autorización de la FDA para llevar a cabo las primeras pruebas de diagnóstico basadas en anticuerpos monoclonales ⁴¹.



Jay Levy y colaboradores aislan por primera vez el virus del SIDA, casi al mismo tiempo que el Instituto Pasteur en París ⁴¹.

Fig. 48⁽¹⁷⁹⁾

1984

Primera clonación y secuenciación del genoma completo del VIH ⁴¹

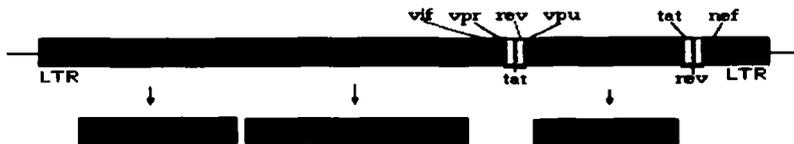


Fig. 49. Genoma HIV⁽¹⁸⁰⁾

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Charles R. Cantor y Davis Schwartz descubrieron la electroforesis en gel por campos de pulsos (PFGE), introduciendo un nuevo método para separar DNA. En particular, la PFGE es efectiva para DNAs extremadamente grandes, aumenta el límite de la separación de DNA en agarosa de 20 – 50 Kb hasta 10 Mb ³⁴.

Fig. 50. Charles Cantor ⁽¹⁸¹⁾

1986

Applied Biosystems Inc. desarrolla el secuenciador de fluorescencia de DNA automatizado ²⁵.

1987



Fig. 51⁽¹⁸²⁾

Maynard Olson y colaboradores inventaron los cromosomas artificiales de levaduras, vectores de expresión para proteínas grandes. Olson es uno de los primeros activistas a favor del Proyecto Genoma Humano y testifica ante el Congreso de los Estados Unidos y ante varios organismos científicos internacionales. Actualmente Olson continúa supervisando los estudios de secuenciación y trabaja para desarrollar nuevos métodos para automatizar la difícil tarea de secuenciación del Proyecto Genoma Humano ¹³.

1988



Fig. 52⁽¹⁸³⁾

Philip Leder y Timothy Stewart obtienen la primera patente de un animal creado por Ingeniería Genética; un ratón que es altamente susceptible al cáncer de seno ¹³.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Fig. 53. Ratón transgénico con tumor en el cuadrante superior derecho que contiene un transgen oncogénico que predispone a carcinoma mamario. ¹⁸⁴

1989



Fig. 54⁽¹⁸⁵⁾

Sir Alec Jeffreys acuñó el término “huellas digitales de DNA” y fue el primero en utilizar polimorfismos de DNA en casos de paternidad, inmigración y asesinato¹³.

En 1980, otro grupo de científicos hizo uso de los mayores descubrimientos en el estudio del polimorfismo de DNA, la primera región hipervariable del DNA humano. Se encontró que estas regiones eran secuencias cortas repetidas una y otra vez. Jeffreys encontró que estas secuencias llamadas “minisatélites” contenían ciertas secuencias “centrales”. Esto abrió el camino para el desarrollo de sondas, que contienen las secuencias centrales y pueden detectar por lo tanto muchas otras regiones variables de DNA. Este método ofreció ser un sistema de identificación verdaderamente específico e individual⁴.



Fig. 55⁽¹⁸⁶⁾

Francis Collins identificó el gen que codifica para la proteína reguladora de la fibrosis cística en el cromosoma 7, que cuando muta, ocasiona la enfermedad²¹.

Francis Collins es el Director del Instituto Nacional de Investigación del Genoma Humano. Posteriormente a su descubrimiento sobre la fibrosis cística, junto a sus colaboradores identificó el gen de la neurofibromatosis en 1990. Le siguió el gen de la Enfermedad de Huntington en 1993. Su laboratorio continúa explorando la genética molecular del cáncer de mama, cáncer de próstata, diabetes y otros trastornos. Collins ha supervisado la financiación exitosa de las metas del Proyecto Genoma Humano y ahora está participando en el proceso de secuenciación⁴.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1990



Fig. 56⁽¹⁸⁷⁾

Inicia formalmente el Proyecto Genoma Humano---de 15 años--- y representa el esfuerzo conjunto de muchos científicos para encontrar todos los genes en cada cromosoma del cuerpo y determinar su naturaleza bioquímica. El Proyecto Genoma Humano es un esfuerzo ambicioso para entender las instrucciones hereditarias que nos hacen únicos. A meta de este esfuerzo es encontrar la localización de más o menos 100,000 genes humanos y leer el código genético entero, 3billones de bits de información, para el año 2005²⁸.

1991



Fig. 57⁽¹⁸⁸⁾

Se catalogó una lista de 5,600 genes conocidos o que se pensaba se heredan mediante el patrón Mendeliano. La fotografía muestra un juego completo de cromosomas de un paciente con Leucemia promielocítica aguda. Una nueva técnica llamada Tinción de cromosomas permite la distinción visual entre los cromosomas y puede utilizarse para mostrar las traslocaciones cromosomales que ocurren con frecuencia en cánceres humanos¹³.

1992



Fig. 58 *Saccharomyces spp.* Esporulando⁽¹⁸⁹⁾

Se publica la secuencia completa (315,000 nucleótidos) de uno de los 16 cromosomas de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*²⁸.

1993



Fig. 59⁽¹⁹⁰⁾

La FDA declara que los alimentos elaborados mediante la Ingeniería Genética no son peligrosos y no requieren regulaciones especiales¹³.



Fig. 60⁽¹⁹¹⁾

Los investigadores clonan embriones humanos y los mantienen en una caja de petri por varios días¹³.

Daniel Cohen produce un mapa rústico de los 23 pares de cromosomas humanos¹³.

1994

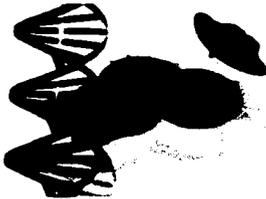


Fig. 61⁽¹⁹²⁾

El primer alimento desarrollado por Ingeniería Genética, tomates, creados por la empresa Flavr Savr, que tienen una vida en estantería más larga fue aprobado por la FDA⁴⁶.

1995



Fig. 62. Logotipo de la Asociación Europea de Terapia Génica.¹⁹³

Se inicia el uso de terapia génica y de anticuerpos desarrollados por Ingeniería Genética¹³.



Craig Venter, Smith, Fraser y colegas reportaron la primer secuencia completa el genoma de un microorganismo no viral: *Haemophilus influenzae* ²⁸.

Fig. 63⁽¹⁹⁹⁴⁾

Quando el Presidente Clinton ofreció una conferencia de prensa en Junio 2000 para expresar lo que fue una de las principales avances de este siglo "La descomposición del código genético humano"; dos hombres estaban de pie en la Casa Blanca para compartir el crédito: Francis Collins, director del Instituto Nacional de Investigación del Genoma Humano y J. Craig Venter, Presidente de Celera Genomica, los cuales fueron reconocidos, correctamente como los jugadores más importantes en el gran esfuerzo mundial de descifrar las 3 billones de "Letras" del genoma humano ⁴⁴.

1997



Fig. 64⁽¹⁹⁹⁵⁾

El Instituto Roslin en Edimburgo reportó el nacimiento de la oveja Dolly, el primer mamífero clonado a partir de un adulto utilizando las técnicas modernas de la clonación transgénica. Esta clonación exitosa sugiere la posibilidad de utilizar esta técnica en la clonación de humanos ⁶.

1998



Dos equipos de investigadores lograron hacer crecer células madre de embrión. En teoría, sería posible manipular genéticamente estas células para convertirlas en cualquier tipo de tejido humano que se deseara ¹³.

Fig. 65 Removiendo el núcleo de un óvulo.¹⁹⁶

1999



Los investigadores del Proyecto Genoma Humano reportaron la secuencia completa del DNA del cromosoma 22 humano ²⁸.

Fig. 66⁽¹⁹⁹⁷⁾

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2000



Los líderes del Proyecto genoma Humano anuncian la terminación de un esquema de la secuencia del DNA de todo el genoma humano. Inicia la era post-genómica ²⁸.

Fig. 67⁽¹⁸⁴⁾

2001

La primera versión del mapa completo del genoma humano es publicada en las revistas Journal of Science y Nature ¹³.



Fig. 68⁽¹⁸⁵⁾

En Octubre 13, 2001 se producen lo primeros embriones humanos utilizando la técnica de clonación ⁵².

2003

Se anuncia que el Proyecto Genoma Humano se ha completado gracias a la acción conjunta de seis países: China, Francia, Alemania, Japón, Gran Bretaña y Estados Unidos. Este anuncio llega 50 años después del descubrimiento de la estructura del DNA hecho por Watson y Crick, ayudados por el trabajo invaluable de Franklin y Wilkins ^{120, 121}.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CAPÍTULO 2 ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DEL DNA Y RNA

2.1. EI DNA Y SU HISTORIA

El DNA fue descubierto como el mayor componente del núcleo celular casi al mismo tiempo que Mendel y Darwin publicaron sus trabajos. Sin embargo, durante los primeros años del siglo XX las proteínas eran consideradas mejores candidatos a moléculas capaces de transmitir grandes cantidades de información hereditaria de generación en generación. A continuación veremos una reseña histórica de tan grande hazaña científica.

James Watson llegó al laboratorio Cavendish de la Universidad de Cambridge en 1951 para unirse a un pequeño grupo de físicos y químicos que trabajaban sobre las estructuras tridimensionales de las proteínas. En aquel tiempo Francis Crick tenía 35 años y era casi un desconocido. Se dedicaba preferentemente al estudio de las teorías que trataban de resolver las estructuras de las proteínas. A pesar de los experimentos que realizaba Avery que demostraban que los caracteres hereditarios podían ser transmitidos de una generación a otra por moléculas purificadas de DNA, la mayoría de los científicos no creía en su importancia como para apartarse del campo de sus respectivas investigaciones. Lo mismo pensaba Crick, aunque sí estaba interesado en los trabajos que realizaba Maurice Wilkins en Londres sobre la difracción de rayos X del DNA. James Watson se sintió estimulado por los trabajos de Wilkins y en la primavera de 1951 ya se dedicaba al estudio del DNA porque quería aprender qué eran los genes. Conoció a Wilkins en Nápoles e intentó unirse a su grupo de trabajo pero no fue posible. Sin embargo, Watson no olvidó la fotografía del DNA. Más tarde, tuvo noticia de la conferencia de Linus Pauling donde explicaba que había resuelto parcialmente la estructura de las proteínas, con su modelo de la hélice α , lo que aumentó el deseo de Watson de adquirir todos los conocimientos necesarios sobre el DNA. Gracias a la ayuda de Salvador Luria que fue su profesor consiguió un puesto en Cambridge colaborando con John Kendrew en su estudio de la mioglobina proteínica. Fue ahí donde conoció a Francis Crick y pasaban todo su tiempo libre debatiendo. Sus conversaciones se centraron rápidamente en cómo se combinaban los genes y decidieron imitar a Linus Pauling y derrotarle en su propio terreno. De la lectura de las publicaciones profesionales descubrieron que la hélice α no había sido elucidada con sólo el estudio de las fotografías de rayos X; en lugar de ello, el procedimiento esencial era preguntar qué átomos solían situarse uno junto a otro. En vez de lápiz y papel, los principales instrumentos de trabajo eran un conjunto de modelos moleculares que se asemejaban a los juguetes de los niños en edad preescolar. Por lo que Watson y Crick decidieron resolver el DNA de la misma manera. Jugarían con modelos moleculares y con suerte la estructura representaría una hélice ya que nunca pensaron que sería mucho más compleja. Lo que sí tenían claro era que la estructura tenía que ser de una regularidad tal que asegurara que se formaran los agregados cristalinos estudiados por Maurice Wilkins y Rosalind Franklin; por lo que consideraron la espina dorsal azúcar-fosfato y buscaron una configuración tridimensional helicoidal en la que todos los grupos de esta espina dorsal tuvieran un medio ambiente químico idéntico. Wilkins había dicho a Crick que el diámetro de la molécula de DNA era más grueso de lo que sería si sólo estuviera presente una sola cadena polinucleótida por lo que pensaron que la cadena de DNA era una hélice compuesta, formada de varias cadenas polinucleótidas enrolladas una en torno a la otra; pero aún faltaba decidir si las cadenas estarían unidas por enlaces de hidrógeno o por eslabones de sal que afectarían los grupos fosfato de carga negativa. Había otro problema y era que existían cuatro tipos de nucleótidos en el DNA, que no eran completamente diferentes. Así pues postularían que la cadena azúcar-fosfato era regular y el orden de bases muy irregular. La secuencia de estas no podría ser la misma ya que si lo eran, todas las moléculas de DNA serían idénticas y no existiría la variabilidad que debería existir entre un gen y otro. Dado que eran muy necesarias las fotografías de rayos X de Maurice Wilkins

decidieron hablar con él y para su sorpresa él mismo había concluido que la estructura era una hélice pero que para construirla se utilizaban tres cadenas polinucleótidas.⁹⁶

Otro cristalógrafo; V. Vand expuso una teoría de la difracción de rayos X por moléculas helicoidales, pero un profesor de la misma área, Bill Crochran encontró fallos en esta, al igual que Crick y empezaron a considerar como deberían establecerse las ecuaciones. Después de trabajar sobre éstas comprobaron cuidadosamente la hélice o mediante la inspección visual de los diagramas de rayos X. Prepararon un manuscrito que se publicó en *Nature* y se le envió una copia a Linus Pauling.⁹⁷

Watson y Crick continuaron trabajando en sus modelos moleculares y se toparon con otro problema. No sabían qué era lo que neutralizaba las cargas negativas de los grupos fosfato de la molécula de DNA ni como se situaban en tres dimensiones los iones orgánicos. Tuvieron que recurrir al experto: Linus Pauling y su libro "The Nature of the Chemical Bond", lo que les suministró los valores correctos para los tamaños exactos de los iones orgánicos en cuestión. Los primeros modelos que hicieron desecharon las hélices de una sola cadena por ser incompatibles con las pruebas de que disponían. En cuanto a las fuerzas que mantenían unidas a las cadenas, la mejor suposición parecía ser la que situaba la presencia de puentes de sal, en los que cationes divalentes como Mg^{2+} unían a dos o más grupos fosfato. Pero esta teoría no era correcta porque en las fotografías de rayos X no había pruebas de ningún ion divalente. Una segunda teoría formulaba que 3 cadenas se enrollaban una en torno a otra, dando lugar a una repetición cristalográfica cada 28 Å a lo largo del eje de la espiral. Pero había que comprobarlo con las mediciones cuantitativas de Maurice Wilkins y Rosalind Franklin y estos rechazaron completamente el modelo, en particular la incertidumbre de si los iones Mg^{2+} eran importantes.⁹⁸

Pero Francis Crick no quería darse por vencido, aunque a él y a Watson se les obligó a abandonar el DNA por un tiempo, siguieron sus investigaciones. Francis supo que un casi riguroso argumento insinuaba que Adenina y Timina debían unirse entre sí por sus superficies planas. Un argumento similar podía aducirse para las fuerzas de atracción entre Guanina y Citosina. Esos eran los pares de bases que Chargaff había demostrado que se presentaban en cantidades iguales. El problema era la clase de fuerzas que las mantenían unidas. Crick arguyó que los enlaces específicos de hidrógeno no constituían la solución. No podían suministrar la especificidad exacta necesaria, ya que otros colegas químicos les decían repetidamente que los átomos de hidrógeno de las bases de purina y pirimidina no poseían emplazamientos fijos, sino que se movían irregularmente de un punto a otro. Francis Crick tenía la impresión de que la duplicación del DNA implicaba la existencia de fuerzas específicas de atracción entre las superficies planas de las bases. Nuevamente tuvieron que posponer sus teorías por problemas académicos y financieros, pero esto sirvió para que tanto dentro como fuera de Cambridge se fuera generalizando la idea de que la inteligencia de Crick era verdaderamente valiosa ya que siempre había sido considerado por sus colegas como una máquina parlante sin credibilidad. James Watson se dedicaba en ese tiempo al estudio de los caracteres sexuales bacterianos. Más tarde cuando leyó estudios bioquímicos sobre las interrelaciones del DNA, el RNA y la síntesis de proteínas, la evidencia lo llevó a considerar que el DNA era el soporte sobre el que se construían las cadenas de RNA. A su vez, las cadenas de RNA eran los candidatos más aptos como soportes de la síntesis de proteínas. Sujetó una hoja de papel en la que dibujó el diagrama: DNA → RNA → Proteína. Las flechas no significaban transformaciones químicas, sino que expresaban la transferencia de información genética desde las secuencias de nucleótidos en las moléculas de DNA a las secuencias de aminoácidos de las proteínas. Esto lo motivó a reanudar los intentos de elucidar la estructura del DNA. Pero de pronto, Linus Pauling anunció que había descifrado la estructura del DNA: un modelo de una hélice de tres cadenas con la cadena de azúcar-fosfato en el centro. Al estudiar el manuscrito, Watson notó que algo andaba mal, se dio cuenta de que los grupos fosfato del modelo de Linus no estaban ionizados, sino que cada

grupo contenía un átomo de hidrógeno enlazado y por ello no tenía una carga definida. En cierto sentido, el ácido nucleico de Pauling no era en realidad un ácido. Además, los grupos fosfato sin carga no eran características incidentales. El hidrógeno formaba parte de los enlaces que unían a las tres cadenas. Sin los átomos de hidrógeno, las cadenas se desprenderían unas de las otras y la estructura se desmoronaría. Así pues, el mejor químico del mundo había cometido un error de química elemental, lo que permitía a Watson y Crick seguir en el juego. Poco después Rosalind Franklin había obtenido la prueba de una nueva forma tridimensional del DNA. Ocurrió cuando las moléculas fueron rodeadas de una gran cantidad de agua. Era la estructura B, con la que se tuvo la certeza de que era una estructura helicoidal. Ya que con la forma A nunca había sido concluyente. Ahora era abrumadora la evidencia a favor de una hélice. Sin embargo, el problema radicaba en la ausencia de cualquier hipótesis estructural que les permitiese agrupar regularmente las bases en el interior de la hélice, lo que hacía presumir que Rosalind Franklin tenía razón al disponer las bases en el centro y la cadena fundamental en el exterior. La evidencia era que el DNA era una hélice que se repetía cada 34 Å a lo largo del eje helicoidal. El reflejo meridional de 3.4 Å sólo podía significar que las bases de purina y pirimidina estaban situadas una encima de otra en una dirección perpendicular al eje helicoidal. Además, por los datos suministrados por el microscopio electrónico y por la evidencia de rayos X, podían estar seguros que el diámetro de la hélice era de unos 20 Å. Pero Crick se negó a aceptar la afirmación de Watson de que el repetido hallazgo de dualidad en los sistemas biológicos indicaba que debían construir modelos de dos cadenas. Pero Watson siguió trabajando con este tipo de modelos, aunque se resistía a situar las bases en el interior porque sospechaba que si adoptaba dicha disposición resultaría un número casi infinito de modelos y se verían entonces ante la imposible tarea de decidir cuál era el correcto. Crick pensaba que había que probar y durante unos días Watson se dedicó a construir modelos con la cadena en el exterior, no era difícil darle una forma compatible con la evidencia aportada por los rayos X, ya que tanto Watson como Crick pensaban que el ángulo de rotación más satisfactorio entre dos bases adyacentes era de 30 a 40 grados. Por contraste, un ángulo dos veces menor parecía incompatible con los ángulos de enlace principales. Así pues, si la cadena estaba situada en el exterior, la repetición cristalográfica de 34 Å tenía que representar la distancia necesaria para una rotación completa a lo largo del eje helicoidal. En este punto el interés de Crick comenzó a avivarse y cada vez con más frecuencia levantaba la vista de sus cálculos para echar un vistazo al modelo. Semana y media después surgió algo importante. Watson comprendió las profundas implicaciones que podían derivar de una estructura de DNA en la que el residuo de Adenina formara enlaces de hidrógeno similares a los hallados en cristales de Adenina pura. Si el DNA era así, cada residuo de Adenina formaría dos puentes de hidrógeno con un residuo de adenina relacionado con él mediante una rotación de 180 grados. Y lo que era aún más importante, dos enlaces simétricos de hidrógeno podían mantener juntos podían mantener también, pares de guanina, citosina o timina. Watson empezó a preguntarse si cada molécula de DNA se componía de dos cadenas con idénticas secuencias de bases, unidas por puentes de hidrógeno entre pares de bases idénticas. No obstante, existía la complicación de que una estructura así no podría tener una cadena regular, ya que las purinas (adenina y guanina) y las pirimidinas (citosina y timina) poseen formas que no son iguales. La cadena resultante debería disponer, pues, de pequeñas hebillas hacia dentro y hacia fuera, según estuviesen en el centro los pares de purinas o de pirimidinas.^{96, 97}

A pesar de la desordenada configuración, a Watson se le aceleró el pulso. Si el DNA era así, crearía una auténtica bomba al anunciar su descubrimiento. La existencia de dos cadenas entremezcladas, con idénticas secuencias de bases, no podía ser fruto de la casualidad. Por el contrario, indicaría que una cadena de cada molécula había servido de plantilla en alguna fase anterior para la síntesis de la otra cadena. Bajo este esquema, la multiplicación de genes comenzaría con la separación de dos cadenas idénticas. Entonces, habían de formarse dos nuevas ramas hijas sobre dos plantillas parentales, dando lugar a dos moléculas de DNA idénticas a la molécula original. Así, el recurso esencial de la multiplicación de los genes podría provenir de la exigencia de que cada base de la

cadena recién sintetizada tuviera siempre un puente de hidrógeno con una base idéntica. Aquella noche, sin embargo, no podía comprender porqué la forma tautómera común de la guanina no había de tener un enlace de hidrógeno con la adenina.

Para el día siguiente, el esquema de Watson quedó hecho trizas. Se alzaba contra él el embarazoso hecho químico de que había elegido inadecuadas formas tautómeras de guanina y timina. Empezó a explicar su esquema al cristalógrafo americano Jerry Donohue declaró que la idea no daría resultado. Las formas tautoméricas estaban mal asignadas, estaba seguro de que la timina tenía asignada, de un modo erróneo, una configuración enol. El se inclinaba por la alternativa cetónica. Así pues, Watson limpió de papeles su mesa a fin de tener una superficie amplia y lisa en la cual formar pares de bases unidas por puentes de hidrógeno. Aunque al principio volvió a su idea de enlazar bases semejantes, al poco rato se dio cuenta de que aquello no conducía a ninguna parte. Comenzó a combinar las bases en otras diversas posibilidades de emparejamiento. De pronto se dio cuenta de que un par Adenina-timina unido por los dos enlaces hidrógeno tenía forma idéntica a la de un par guanina-citosina. Todos los puentes de hidrógeno parecían formarse de un modo natural. No se necesitaba ningún artificio para hacer a los dos tipos de base idénticos en su forma. Esta vez el cristalógrafo Jerry Donohue no tuvo ninguna objeción al respecto. La moral de Watson se fue a los cielos, pues sospechó que ahora había encontrado la solución al enigma de porqué el número de residuos de purina igualaba exactamente al número de residuos de pirimidina. Dos secuencias irregulares de bases podían ser introducidas de un modo regular en el centro de la hélice, siempre que una purina se enlazara por un puente de hidrógeno con una pirimidina. Además, la exigencia de tal enlace de hidrógeno significaba que la adenina se emparejaría siempre con la timina, mientras que la guanina se emparejaría solamente con la citosina. Las reglas de Chargaff emergerían de pronto como consecuencia de una estructura de doble hélice para el DNA. Y, lo que era más excitante, este tipo de doble hélice sugería un esquema de multiplicación mucho más satisfactorio que su idea de emparejar bases semejantes. Emparejar siempre la adenina con la timina y la guanina con la citosina significaba que las secuencias de bases de las dos cadenas entrecruzadas eran complementarias una de otra. Dada la secuencia de bases de una cadena, quedaba automáticamente determinada la de su compañera. De un modo ideal, era así muy fácil ver como una cadena aislada podía ser la plantilla para la síntesis de una cadena de secuencias complementaria.^{96, 97}

Pocos minutos después Crick observó el hecho de que los dos enlaces glucosídicos (que unían una base y un azúcar) de cada par de bases estaban sistemáticamente relacionados por un eje perpendicular al eje helicoidal. Así, ambos pares podían ser volteados y tener aún sus enlaces glucosídicos apuntados en la misma dirección. Esto tenía la importante consecuencia de que una cadena dada podía contener, al mismo tiempo, purinas y pirimidinas. Por otra parte, sugería que las dos cadenas debían correr en direcciones opuestas.

Sólo faltaba un último esfuerzo para que el ensamble definitivo quedara terminado en un par de horas. Usaron las relucientes placas de metal que representaban las bases para hacer un modelo en el que, por primera vez, se hallaban presentes todos los componentes del DNA. En cuestión de una hora, había dispuestos los átomos en posiciones que satisfacían a los datos proporcionados por los rayos X y a las leyes de la estereoquímica. La hélice resultante giraba hacia la derecha con las dos cadenas corriendo en direcciones opuestas. Sólo una persona podía manipular con el modelo, así que Crick esperó a que Watson terminara. Si bien un contacto interatómico era algo más corto que lo necesario para resultar óptimo, no se desviaba de valores publicados. Crick revisó el modelo por espacio de unos quince minutos sin encontrar ningún error aunque, durante breves intervalos, al verle fruncir el seño, a Watson se le cayó el alma a los pies. En todos los casos quedó satisfecho y continuó comprobando el carácter razonable de otros contactos interatómicos. Así pues, todo parecía cuadrar.^{96, 97}

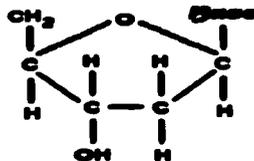
El siguiente paso científico era comparar con rigor los datos experimentales de los rayos X con el modelo de difracción que predecía la nueva molécula. A los dos días Maurice Wilkins y Rosalind Franklin encontraban que sus datos de los rayos X confirmaban plenamente la doble hélice. Iban a publicar en seguida sus resultados y deseaban hacerlo simultáneamente con el anuncio de Watson y Crick sobre los pares de bases. *Nature* era la revista indicada para una pronta publicación. Crick quiso añadir al comunicado ciertas consideraciones acerca de las implicaciones biológicas de su trabajo. Pero al último le pareció mejor una breve observación y compuso la frase "No se nos escapa que el emparejamiento específico que hemos postulado sugiere de inmediato un posible mecanismo reproductor para el material genético". El miércoles 2 de Abril salió con destino a los editores de *Nature*. Linus Pauling aceptó la derrota y celebró con Watson y Crick su descubrimiento.⁹⁶ Recientemente se instituyó el Premio Rosalind Franklin a la excelencia en ciencia, ingeniería y tecnología, fundamentalmente para las mujeres que trabajan en estas áreas.¹²⁶ El descubrimiento de la estructura del DNA transformó a la Biología profundamente, catalizando el proceso de secuenciación del genoma humano y engendrando una nueva visión de la Biología como ciencia informativa. Dos características de la estructura del DNA son las de mayor importancia para ejercer el impacto que ha tenido sobre la ciencia: su naturaleza digital y su complementaridad. El DNA tiene dos tipos de información digital – los genes, que codifican proteínas y los cuales son las máquinas moleculares de la vida; y los mecanismos de regulación de genes que especifican su comportamiento.¹²³

Los elementos necesarios para la conformación del DNA son los siguientes:

- 1) Un *azúcar* de 5 carbonos. En el caso del DNA este azúcar es desoxiribosa.
- 2) Un anillo heterocíclico formado de carbono y nitrógeno llamado *base*.
- 3) Un grupo fosfato.

2.1.1 La Desoxiribosa

Este carbohidrato está compuesto de cinco carbonos. El primero y cuarto están unidos por un átomo de oxígeno. El tercero tiene un átomo de hidrógeno y un grupo hidroxilo. El OH en el quinto carbono se une al grupo fosfato. El segundo carbono sostiene sólo átomos de hidrógeno⁶⁰.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Fig. 69. Estructura de Desoxiribosa mostrando el sitio de unión de la base.⁶⁵

2.1.2 Las Bases Nitrogenadas

Las cuatro bases de DNA se agrupan en dos categorías. Aquellas con anillos de seis miembros se llaman *pirimidinas* y aquellas con anillos de nueve miembros se denominan *purinas*.

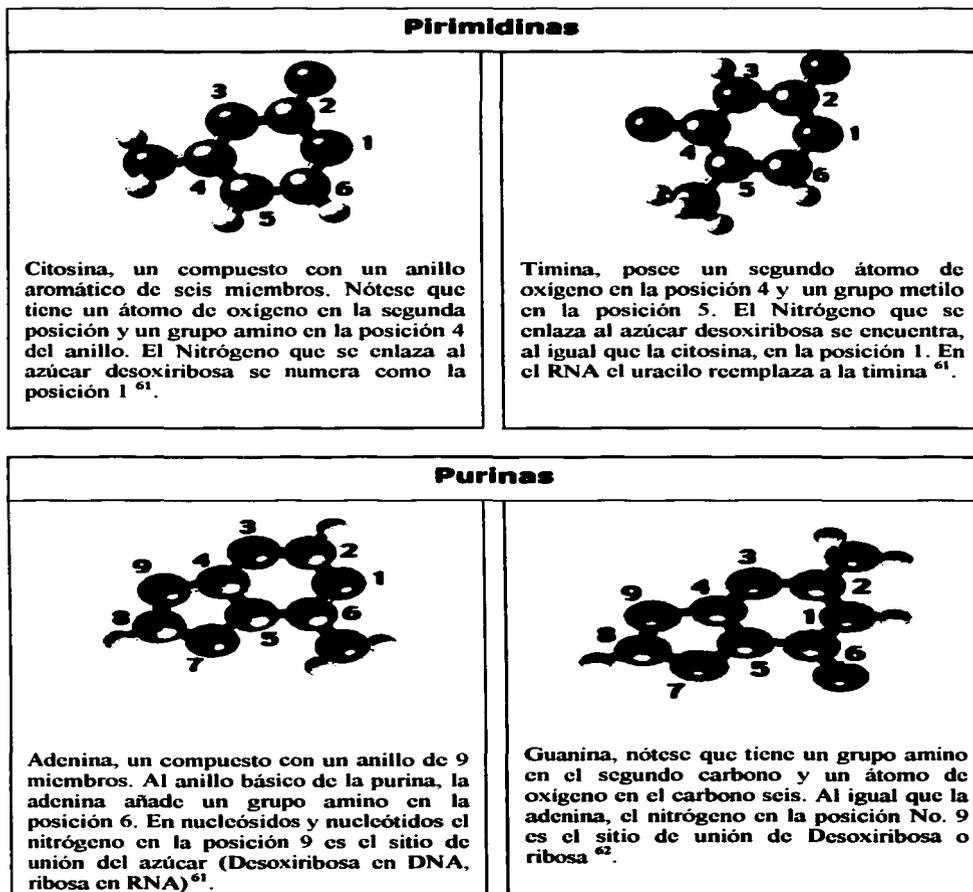


Fig. 70. Estructura de las bases púricas y pirimidicas.⁶¹

2.1.3 El Grupo Fosfato

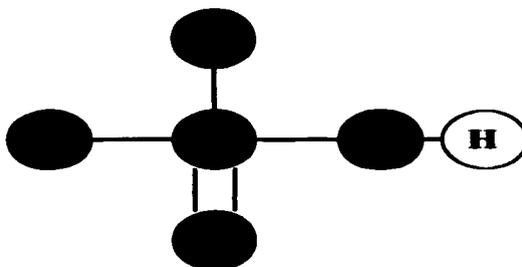
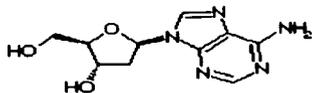


Fig. 71. Estructura del grupo fosfato.

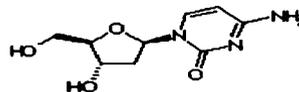
2.2 NUCLEÓSIDOS

Un nucleósido es una de la cuatro bases del DNA unida covalentemente al C1 de un azúcar⁶³. En el caso del DNA el azúcar es desoxirribosa, por lo tanto se les llama desoxinucleósidos. Los cuatro diferentes nucleósidos de DNA son (Fig. 72):

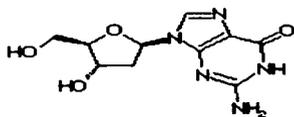
Desoxiadenosina (dA)
Desoxiguanosina (dG)
Desoxicitosina (dC)
Desoxitimidina (dT)



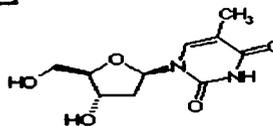
dA



dC



dG



dT

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Fig. 72. Los cuatro diferentes nucleósidos del DNA.⁶⁴

2.3 NUCLEÓTIDOS

Son ésteres de fosfato de los nucleósidos y son de naturaleza ácida. El ácido fosfórico se puede localizar en el C 2', 3' o 5' del residuo de carbohidrato. Sin embargo los desoxiribonucleótidos los tienen en la posición 5'.

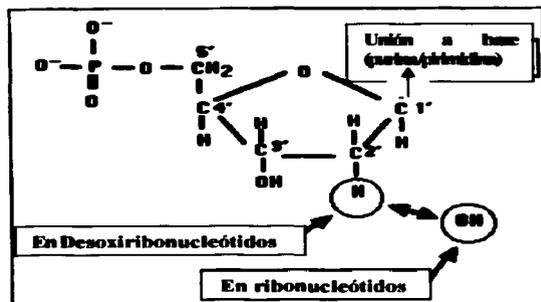


Fig. 73. Estructura de un Nucleótido⁶⁴

El ácido fosfórico puede sufrir fosforilaciones posteriores para producir difosfatos y trifosfatos, por ejemplo ADP y ATP. Así, para cada nucleótido monofosfato existe también un nucleótido difosfato y un nucleótido trifosfato. Los nucleótidos di y tri no están presentes en el DNA o RNA, únicamente los nucleótidos monofosfato. Los di y trifosfatos están presentes de manera natural y tienen funciones muy importantes en muchos aspectos del metabolismo celular⁶⁴.

Tabla 1. Nomenclatura de Nucleótidos del DNA.⁶⁴

Base	Nucleósido	Nucleótido	Abreviación
Adenina	Adenosina	Adenosin Monofosfato	AMP
Guanina	Guanosina	Guanosin Monofosfato	GMP
Citosina	Citidina	Citidin Monofosfato	CMP
Timina	Timidina	Timidin Monofosfato	TMP

2.3.1 La importancia celular de los nucleótidos

- ▶ Como energía para el metabolismo (ATP)
- ▶ Son las unidades monoméricas de los ácidos nucleicos
- ▶ Regulación de procesos fisiológicos:
 - La adenosina controla el flujo sanguíneo coronario.
 - AMPc y GMPc funcionan como señales moleculares.
- ▶ 5'AMP es componente de coenzima en FAD/NAD+
- ▶ Intermediarios activados – UDP-glucosa
- ▶ Efectores alostéricos.- Se regulan a si mismos y a otros.

TESIS CON
FALLA DE URGEN

2.4 CONFORMACIÓN DEL DNA

La Columna Vertebral del DNA es un polímero con una secuencia alternada azúcar – fosfato. Los carbohidratos desoxiribosa se unen en sus grupos 3'-OH y 5'-OH a los grupos fosfato en enlaces éster, también conocidos como enlaces fosfodiéster⁶³. El fosfato de un nucleótido se une al carbono 3 de otro nucleótido. A su vez, el fosfato de este nucleótido se une al carbono 3 del siguiente nucleótido⁶⁵. Si esto ocurre muchas veces se empieza a formar una larga cadena de nucleótidos, tal como se muestra en la figura 74:

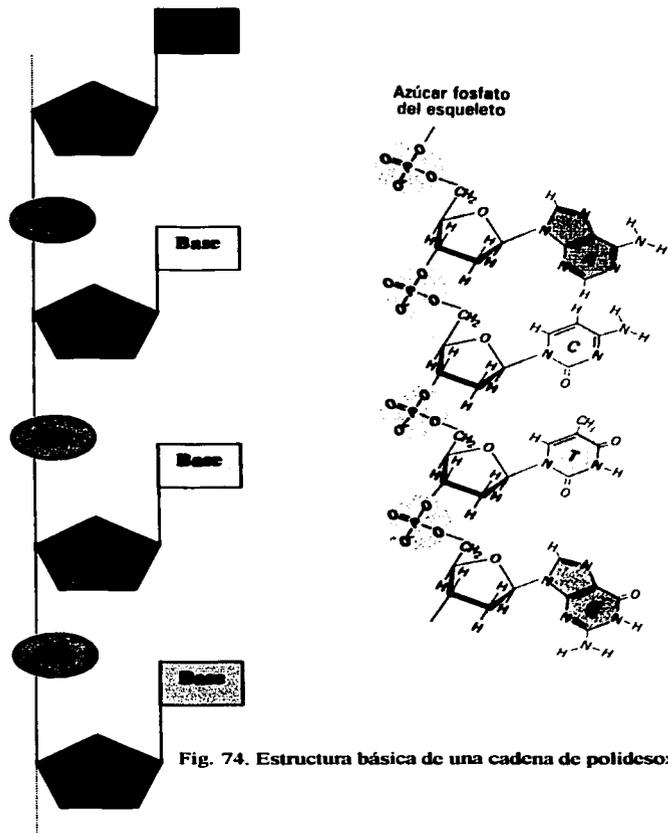


Fig. 74. Estructura básica de una cadena de polidesoxiribonucleótidos de DNA.⁶⁶

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2.4.1 Características de una cadena de DNA

- 1) El esqueleto está formado de desoxiribosa y grupos fosfodiéster alternados.
- 2) La cadena tiene una dirección 5' a 3' o viceversa, según sea el caso.
- 3) Los átomos de oxígeno de los grupos fosfato son polares y están cargados negativamente.
- 4) Las bases A, G, C, T se extienden a partir de la cadena y se superponen.
- 5) Las bases son hidrofóbicas ⁶³.

Dos cadenas de DNA se unirán para dar lugar a la doble hélice, esta unión se llevará a cabo por medio de puentes de hidrógeno que unirán a las bases que se encuentran en la parte interna de la cadena. Las bases puricas sólo pueden unirse a las bases pirimídicas, debido a sus diferencias estructurales. Así, la Adenina es una purina que se unirá a la piridina Timina, y la Guanina es una purina que se unirá a la piridina Citosina ⁶⁴. A esto se le conoce como *Pares de Bases y Complementaridad*. Ver Fig. 75.

La segunda diferencia estructural entre estas bases es el número de enlaces de hidrógeno que cada una tiene. La Adenina y Timina tienen dos, mientras que la Citosina y Guanina tienen tres. Una base con dos enlaces no puede unirse a una que tenga tres y viceversa. Por lo que la Adenina sólo puede unirse a la Timina y la Citosina a Guanina.

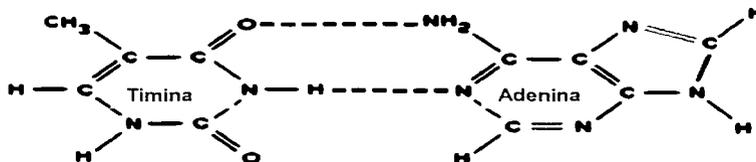
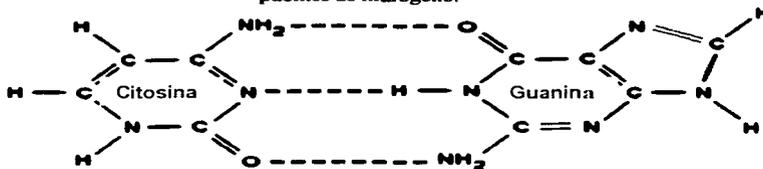


Fig. 75. Formación de los pares de bases mediante puentes de hidrógeno. ⁶⁵



¿Cuál es la importancia de tener dos o tres sitios de enlace para hidrógeno? Estos sitios evitan que ocurran mutaciones. Si las bases no tuvieran un mecanismo de control entre ellas sería un caos porque podrían unirse todas entre sí. Los puentes de hidrógeno no sólo mantienen el orden entre las bases sino que mantienen a las dos cadenas de DNA unidas ⁶⁵. De esta manera se conforma la doble cadena de DNA. Esta se dobla para formar una hélice ⁶⁶. Los elementos que conforman esta estructura fueron propuestos por Watson y Crick en 1953 ⁷².

1. La molécula se compone de dos cadenas de nucleótidos.
2. Las dos cadenas se enrollan alrededor de un eje central formando un par de hélices derechas y avanzan girando en dirección de las manecillas del reloj.
3. El esqueleto azúcar – fosfato – azúcar – fosfato se localiza en el exterior de la molécula con los dos grupos de bases proyectándose hacia el centro.
4. Las bases ocupan planos aproximadamente perpendiculares al eje longitudinal de la molécula y por lo tanto se colocan una sobre otra igual que platos apilados. Las interacciones hidrófobas y las fuerzas de Van der Waals entre las bases planares apiladas estabilizan toda la molécula de DNA. Las vueltas helicoidales y los pares de bases planares, en conjunto, confieren a la molécula el aspecto de una escalera de caracol.
5. La distancia del átomo de fósforo del esqueleto al centro del eje es de 10 Å, por lo tanto, la anchura de la doble hélice es de 20 Å.
6. Los átomos de nitrógeno unidos al carbono 4 de la citosina y al carbono 6 de la adenina muestran predominantemente la configuración amino (NH₂) y no la forma imino (NH). De manera similar, los átomos de oxígeno enlazados al carbono 6 de la Guanina y al carbono 4 de la Timina predominantemente muestran configuración ceto (C=O) en vez de configuración enol (C-OH). Estas restricciones estructurales en la configuración de las bases sugieren que la única purina estructuralmente capaz de enlazarse a Timina es Adenina y Guanina a Citosina.
7. Las dos cadenas que componen una doble hélice corren en direcciones opuestas, o sea, son antiparalelas. Por lo tanto, si una cadena se encuentra alineada en la dirección 5' - 3', la otra se encontrará en la dirección opuesta. Al observar la molécula desde el exterior se nota que en el espacio entre vueltas adyacentes de la hélice se forman dos surcos de diferente amplitud: un surco mayor más ancho y un surco menor más estrecho, que rodean en espiral la superficie externa de la doble hélice. Las proteínas unidas al DNA casi siempre se alojan en estos dos surcos.
8. La doble hélice efectúa una vuelta completa cada 10 residuos (3.4 nm), o 150 vueltas por cada fragmento igual a un millón de veces el peso molecular.
9. No hay restricción alguna sobre la secuencia de bases de determinada cadena de la molécula. Sin embargo, una vez especificada la secuencia particular de una cadena automáticamente queda determinada la secuencia de la otra cadena. Esta relación entre las dos cadenas de la doble hélice se conoce como *complementaridad*⁵⁸. Ver Fig. 76.

Estudios recientes establecen la hipótesis de que la complementaridad y las interacciones entre las bases apiladas pueden ser suficientes para mantener la estabilidad de la estructura del DNA y la especificidad de este durante la replicación, aún en ausencia de enlaces de hidrógeno entre los pares de bases.¹²⁴

2.4.2 Importancia del DNA

- a) Almacén de Información Genética.- El DNA es una “plantilla” molecular, un registro de instrucciones precisas almacenadas que definen todas las características hereditarias mostradas por un organismo.

- b) **Autoduplicación y Herencia.**- Puesto que el DNA contiene toda la plantilla de un organismo, debe contener la información para su propia duplicación. LA duplicación del DNA es un medio para transmitir instrucciones genéticas de una célula a sus células hijas o de un individuo a su descendencia.
- c) **Expresión del mensaje genético.**- Durante muchos años los biólogos sospecharon que los genes individuales transportan información para sintetizar proteínas específicas. Debía existir algún mecanismo para utilizar la información almacenada en un gen en la síntesis de polipéptidos específicos ⁵⁸.

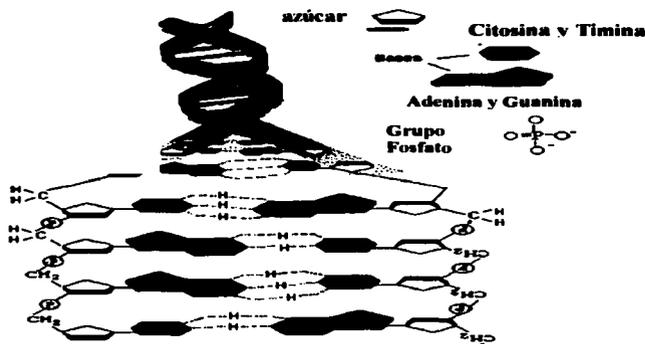


Fig. 76. La Molécula de DNA. ¹⁸⁶

- d) Investigaciones recientes confirman que un novedoso diseño en la estructura de DNA le confiere gran estabilidad contra las enzimas de digestión, lo que le confiere el potencial para combatir una variedad de enfermedades como cáncer, asma, alergias e infecciones. ¹²⁵

2.4.3 Tipos de DNA

Los resultados de los estudios de cristalografía de rayos X demuestran que el DNA puede tener varias conformaciones, el más común es el DNA-B. El DNA-B es una doble hélice con giro a la derecha con un surco ancho y uno estrecho ⁶⁶. Las bases son perpendiculares al eje de la hélice. Al parecer esta forma representa la conformación de la molécula como existe dentro de la célula (Fig. 77).

Fig. 77. DNA-B²⁰¹

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

El DNA también se encuentra en la forma A, las fibras en las cuales se hace el estudio se encuentran mas secas que en la forma B que es mas hidratada; en la forma A, el surco mayor es muy profundo y el menor es superficial ⁶⁶. En realidad las formas A y B son muy similares entre si, ambas son hélices con vueltas de cuerda a la derecha. Hay otros cambios, sin embargo, incluyendo un notable acortamiento de la fibra, cambio en la pendiente de la hélice de 3.4 a 2.7 Å de elevación por cada par de bases, etc ⁵⁸. (Fig. 78)



Fig. 78. DNA-A²⁸²

Se descubrió otro tipo de conformación estudiando patrones de difracción de rayos X en cristales de un DNA sintético que sólo contenía pares de bases G-C. A diferencia de los anteriores, esta molécula se enrolla en sentido contrario, es decir, a la izquierda, con un trayecto continuo en zig-zag, por lo que se le llamó DNA-Z ⁵⁸. Aún no se sabe si esta forma de DNA existe *in vivo*, ya que se afirma que sólo es estable en condiciones no fisiológicas. (Fig. 79)



Fig. 79. DNA-Z²⁸³

2.4.4 Conformación de Superhélice

Existen moléculas de DNA que sedimentan con mayor rapidez que otras porque tienen una forma mas compacta debido a que la molécula se enrolla sobre sí misma, muy parecido a un cable de teléfono enrollado sobre sí mismo luego de usarse. Este estado del DNA se conoce como "superhélice". En esta forma el DNA es más compacto que su contraparte relajada, ocupa menos volumen y se mueve con mayor rapidez en un campo de fuerza centrífuga o eléctrica ⁵⁸. (Fig. 80)

Se dice que la superhélice de DNA es *negativa* cuando se genera por desenrollamiento y *positiva* cuando se forma por retorcimiento excesivo. El DNA presente en la naturaleza (mitocondrial, viral, bacteriano) invariablemente presenta conformación de superhélice negativa. El enrollamiento excesivo no se restringe al DNA circular pequeño, también ocurre en el DNA lineal eucariota, donde tramos de la molécula se enrollan alrededor de núcleos proteínicos o nucleosomas. La importancia del desenrollamiento es esencial:

- a) Permite la compactación del DNA cromosómico para adaptarse a los microscópicos límites del núcleo celular.
- b) La superhélice DNA negativa está desenrollada y por lo tanto ejerce presión en el sentido de separar las cadenas, separación requerida durante la duplicación (síntesis de DNA) y en la transcripción (síntesis de RNA) ⁵⁸.

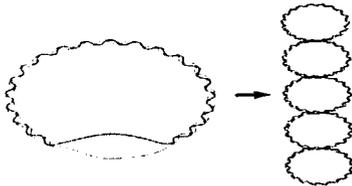


Fig. 80.- DNA poco enrollado que en promedio tiene más de 10 pares de bases por vuelta. Por estar poco enrollada adopta espontáneamente la forma superhelicoidal. ⁵⁸

El superenrollamiento del DNA está regulado en cada célula y tiene que ver con su metabolismo. El funcionamiento biológico normal del DNA ocurre sólo si se encuentra en el estado topológico adecuado, es decir, si tiene la estructura adecuada ⁶⁸.

Existen ciertas enzimas en las células que pueden cambiar el estado de superenrollamiento de la doble cadena de DNA, se llaman "topoisomerasas". Alteran el estado topológico del DNA pero no su estructura covalente, estas son de varias clases y se dividen en dos categorías de acuerdo a su mecanismo de acción (Fig. 81).

Topoisomerasas Tipo I.- Son proteínas monoméricas (97KD) que están ampliamente distribuidas tanto en procariontes como eucariontes. Su acción consiste en romper transitoriamente una de las cadenas del par y permitir que gire alrededor de la otra cadena, y después volver a unir la porción rota de la cadena; de este modo disminuye la fuerza de torsión de la molécula. (Fig. 82).

Topoisomerasas Tipo II.- También se les conoce como DNA girasas. Se encuentran en procariontes. Rompen transitoriamente ambas cadenas del par, a continuación transfieren un segmento de DNA a través de la rotura y vuelve a sellar las cadenas cortadas para congelar la molécula en su nuevo estado.

El grado de superenrollamiento de DNA bacteriano está determinado por las acciones opuestas de las dos enzimas. Los superenrollamientos negativos son introducidos por la DNA girasa y removidos por la topoisomerasa tipo I. La cantidad de estas enzimas es regulada para mantener un grado apropiado de superenrollamiento negativo ⁶⁸.

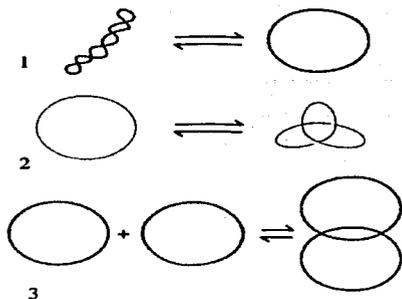


Fig. 81. Reacciones que catalizan topoisomerasas. ⁶⁸

1. Superenrollamiento – relajación
2. Anudar – Desanudar
3. Encadenamiento – Desencadenamiento



Fig. 82. Acción de la Topoisomerasa I, la enzima secciona una de las cadenas de DNA, que gira alrededor de la otra cadena. A continuación la cadena cortada se vuelve a unir. ⁶⁸

2.5 EL RNA

Se cree que la evolución química que condujo a la vida celular sobre la tierra casi hace cuatro millones de años pasó por una etapa en donde el RNA llevó a cabo por sí solo todas las funciones de las macromoléculas modernas (RNA, DNA y proteínas). Sin embargo, el así llamado mundo del RNA era demasiado complejo para evolucionar directamente de las moléculas orgánicas encontradas en la tierra prebiótica. Es muy probable que el mundo del RNA haya emergido y sido alimentado por una especie de metabolismo primitivo basado en los enlaces contenidos en compuestos de azufre llamados tioésteres ⁶⁹.

Los componentes básicos del RNA son los mismos que los del DNA con dos diferencias básicas. La base pirimídica uracilo reemplaza a la timina y el azúcar ribosa sustituye a la desoxiribosa (Fig. 83). La Adenina se une al Uracilo por medio de dos enlaces de hidrógeno ⁶⁷.

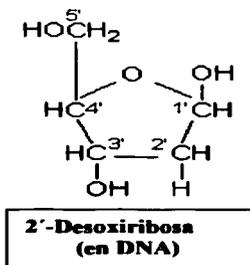
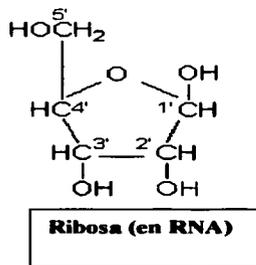
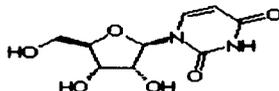


Fig. 83. Los carbohidratos de los ácidos nucleicos. ⁶⁷

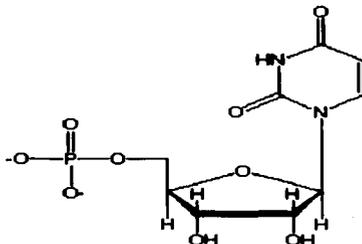
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Para el RNA, los nucleósidos y nucleótidos están formados de la misma manera que para el DNA, con la ribosa en lugar de la desoxiribosa. En la Fig. 84 se muestran el nucleósido (uridina) y el nucleótido (uracil 5' monofosfato) ⁶⁷.

Fig. 84. Uridina⁶⁷



Uracil 5' Monofosfato



Una molécula de RNA es un polímero lineal en el cual los monómeros (nucleótidos) se conservan unidos por medio de enlaces fosfodiéster. Estos, unen el carbono 3 de la ribosa de un nucleótido al carbono 5 de la ribosa del nucleótido adyacente ⁷⁰ (Fig. 85).

La mayoría de las moléculas de RNA celular son de una sola cadena. Pueden formar estructuras secundarias como tallo-lazo y horquilla ⁷¹ (Fig. 86).



Fig. 86. Estructuras Secundarias del RNA⁷¹

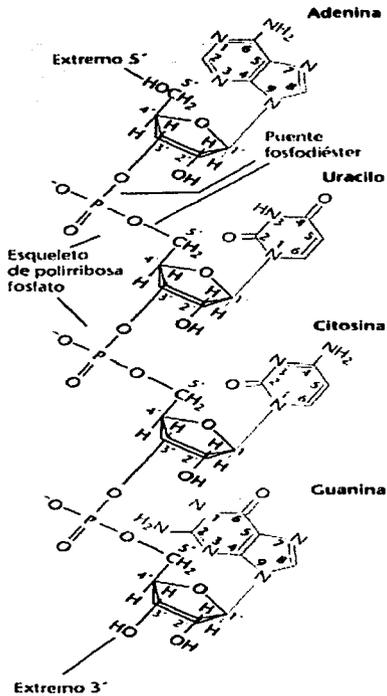


Fig. 85. Estructura primaria del RNA.²⁸

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2.5.1 Tipos de RNA

El principal papel del RNA es participar en la síntesis de proteínas y esto requiere de tres tipos de RNA: RNA mensajero (RNAm), RNA de transferencia (RNAt) y RNA ribosomal (RNAr).

a) RNA Mensajero (RNAm)

Es el ácido nucleico que "graba" la información del DNA en el núcleo de la célula y la lleva a los ribosomas ⁷². El RNAm es transcrito a partir del DNA, llevando información para la síntesis de

proteínas. Tres nucleótidos consecutivos en el RNAm codifican un aminoácido o una señal de "Alto" para la síntesis proteica. Este trinucleótido es conocido como "codon". Véase Fig. 87.

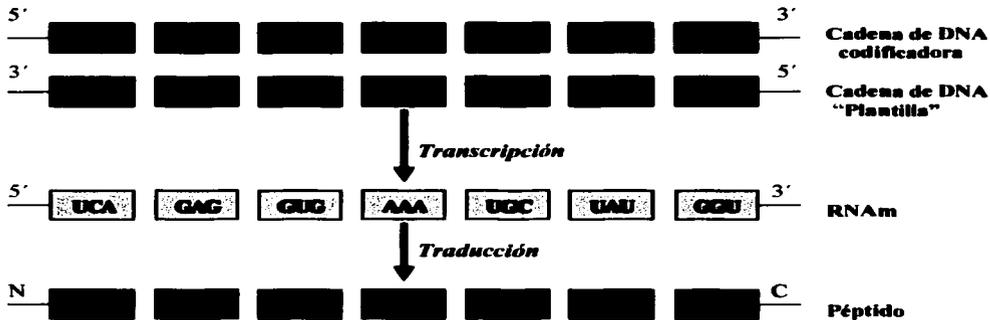
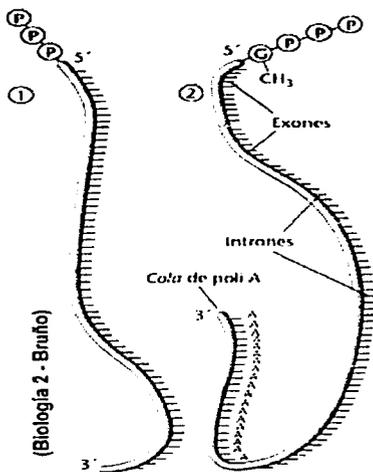


Fig. 87.- La relación entre DNA, RNAm y el péptido codificado. La secuencia de RNAm es complementaria a la plantilla de DNA y de ese modo será la misma que la cadena original, excepto que la T es reemplazada por U.²⁰³

Las características del RNAm son las siguientes:

- Cadenas de largo tamaño con estructura primaria
- Se le llama mensajero porque transporta la información necesaria para la síntesis proteica.
- Cada RNAm tiene información para sintetizar una proteína determinada
- Su vida media es corta
- En procariotes el extremo 5' posee un grupo trifosfato
- En eucariotes el extremo 5' posee un grupo metil-guanosina unido al trifosfato y el extremo 3' posee una cola de poli-A (Fig. 88)

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN



Exón.- Secuencias que se traducen a proteínas

Intrón.- Secuencias sin codificar.

Fig. 88. RNAm de procaríotes (bacterias) (1) y de eucariotes (2).²⁰⁴

b) DNA de transferencia (DNAt)

Entrega los aminoácidos uno por uno a la cadena creciente de proteínas en el ribosoma⁷². El papel principal del RNAt es “traducir” la secuencia del RNAm a una secuencia de aminoácidos. Una molécula de RNAt consiste de 70 – 80 nucleótidos, por lo que son pequeños. Poseen en algunas zonas estructura secundaria, lo que va a hacer que en las zonas donde no hay bases complementarias adquieran un aspecto de bucles, como una hoja de trébol⁸⁰. Estas estructuras se muestran en la Fig 89 y 90, respectivamente. Algunos nucleótidos en el RNAt han sido modificados, es el caso de la Dihidrouridina (D), pseudouridina (Ψ) e Inosina (I). En la dihidrouridina, se añade un átomo de hidrógeno al carbono 5 y 6 del uracilo. En la pseudouridina la ribosa se une al carbono 5 en lugar del N1. La Inosina juega un papel muy importante en el reconocimiento del codon. Además de estas modificaciones, algunos nucleósidos están metilados⁷¹.

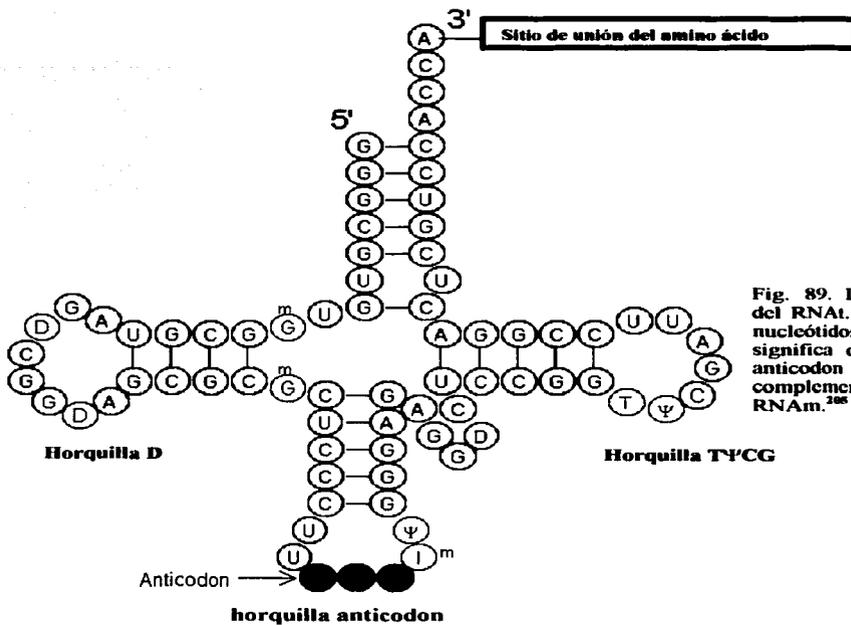


Fig. 89. La estructura secundaria del RNAt. El color azul indica los nucleótidos modificados, "m" significa que están metilados. El anticodon es el trinucleótido complementario al codón del RNAm.²⁸⁵

Fig. 90. La estructura terciaria del RNAt.²⁸⁵



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

c) RNA ribosomal (RNAr)

Este tipo de RNA existe afuera del núcleo, en el citoplasma de la célula en estructuras llamadas ribosomas. Los ribosomas son estructuras granulares y pequeñas en donde la síntesis de proteínas se lleva a cabo. Cada ribosoma es un complejo que consiste de aproximadamente 60% de RNAr y 40% de proteína ⁷².

En procariontes, el RNAr está clasificado en tres categorías: 23S, 5S y 16S. La unidad "S" proviene de *Svedberg*, una medida del índice de sedimentación. Después de que las moléculas de RNAr son producidas en el núcleo, son transportadas al citoplasma donde se combinan con docenas de proteínas específicas para formar un ribosoma. En procariontes el tamaño del ribosoma es de 70S y está formado por dos subunidades: 50S y 30S. El tamaño del ribosoma en mamíferos es de 80S, con una subunidad 60S y otra 40S. Las proteínas de la subunidad mayor se designan como L1, L2, L3, etc (L = Grande). En la subunidad más pequeña las proteínas se denotan como S1, S2, S3, etc ⁷¹. (Fig. 91)

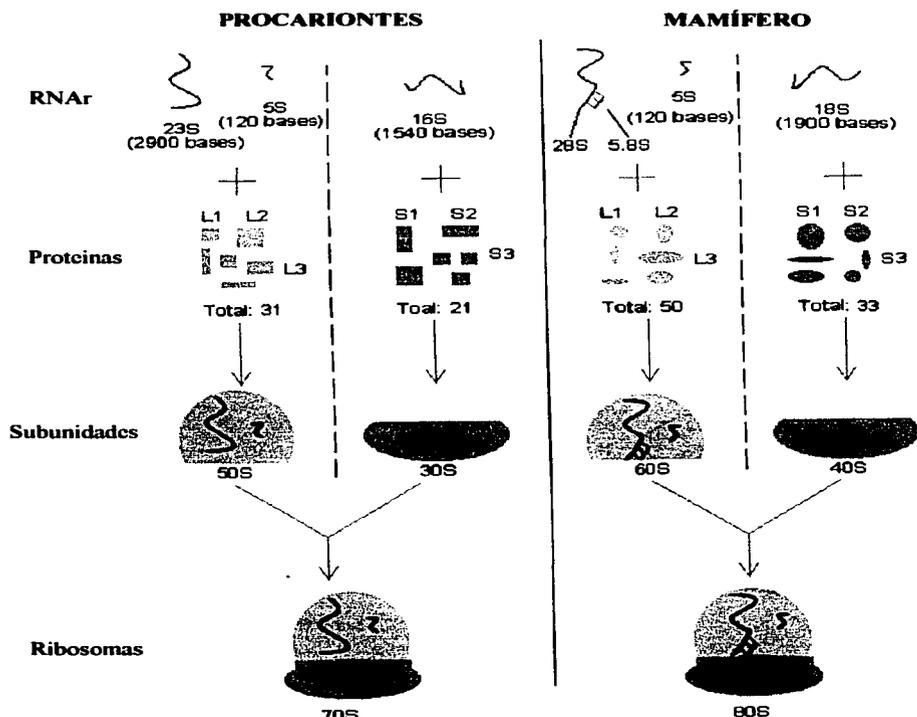


Fig. 91. Estructura de RNAr. ²⁶⁶

Se han caracterizado 73 genes que codifican para proteínas ribosomales y se han encontrado en varias especies eucariotes. Estos genes son pequeños, de aproximadamente 4.4 kb, pero tienen un promedio de 5.6 exones. Se cree que el iniciador ATG se encuentra en el primer o segundo exón⁶⁹. Así mismo, utilizando procedimientos de homologación de secuencias se han identificado 2090 pseudogenes de estas proteínas en el genoma humano⁷¹.

c) Otros tipos de RNA

1. Ribozimas.

Son moléculas de RNA con actividad catalítica. Fueron descubiertas al inicio de la década de los 80's por Thomas R. Cech⁷¹. Este hallazgo tiene varias implicaciones. Primero, significa que el RNA no es únicamente un acarreador pasivo de información genética, sino que puede participar activamente en la bioquímica celular directa. En particular, muchas reacciones de procesamiento de RNA así como la síntesis de proteínas son catalizadas en parte por el RNA. Segundo, el estudio del cómo trabajan estas enzimas puede revelar mecanismos desconocidos de catálisis biológica. Tercero, las ribozimas tienen el potencial de proporcionar nuevos agentes terapéuticos. Por ejemplo; ribozimas con una unión efectiva pueden destruir RNAs virales bajo condiciones controladas de laboratorio, haciendo plausible que las ribozimas puedan ser capaces de inactivar virus en animales, incluso seres humanos⁷³.

2. Moléculas Pequeñas de RNA

Pequeñas moléculas de RNA en el núcleo son denotadas por RNAsn (RNA nuclear pequeño). Una de sus funciones es la de participar en el empalme de RNA. Un RNAsn contiene 107 – 210 nucleótidos. En mamíferos se han identificado seis de estas moléculas y se designan como U1 a U6 ya que sus secuencias son ricas en uracilos. Las pequeñas moléculas de RNA también se encuentran en el citoplasma. Por ejemplo; la partícula de reconocimiento de señal involucrada en el transporte de proteínas contiene una molécula de RNA con una longitud de ~ 300 nucleótidos⁷¹.

3. RNA Heterogéneo Nuclear (RNAhn)

Es un RNA de alto peso molecular, también conocido como transcrito primario del RNA ya que es el RNA recién sintetizado por la RNA polimerasa en el proceso de transcripción. En células procariotas, el transcrito primario actúa directamente como molde para la síntesis de proteínas. En el núcleo de las células eucariotas actúa como precursor de los demás tipos que se encuentran en el citoplasma⁷⁹.

2.6 EL DOGMA CENTRAL

Los genes son segmentos de DNA que contienen una determinada secuencia de nucleótidos que servirá para dirigir la producción de moléculas de RNA de diferentes tipos (RNAm, RNAt, RNAr) que ejercerán diversas funciones, entre éstas, la síntesis de proteínas⁷³. La transferencia de información genética de DNA hasta la estructura primaria de una proteína tiene dos etapas básicas:

- a) Transcripción
- b) Traducción

2.6.1 Transcripción

Es el proceso por medio del cual una cadena de DNA es copiada a una cadena de RNA, es decir, un ácido nucleico genera otro⁷⁴. Este proceso será diferente en procariotes y eucariotes, como se muestra en la Fig. 92. La transcripción se lleva a cabo mediante la acción de una enzima: RNA polimerasa (básicamente).

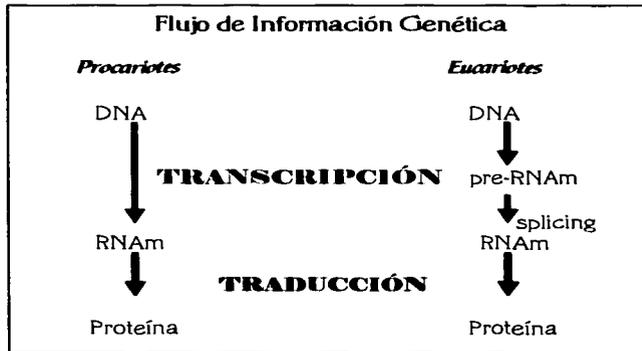


Fig. 92. Las diferencias entre el proceso de transcripción entre procariotes y eucariotes. El proceso en eucariotes lleva pasos adicionales como el de "Splicing".⁷⁴

2.6.1.1 Transcripción en Procariotes

Para iniciar este proceso es necesario contar con la enzima RNA polimerasa y con una región del gen a partir de la cual se iniciará la transcripción, a esta región se le llama "promotor"

Localizados en cada extremo de un gen se encuentran segmentos de DNA llamados "regiones de flaqueo"⁷³, el primero se encuentra localizado en el extremo 5' del gen en donde dos secuencias de nucleótidos específicas indican la región del promotor⁷⁵ (Fig. 93):

- **TTGACAT**, localizada a -35 bases del sitio donde inicia la transcripción, es reconocida por el factor sigma de la enzima.

- **TATAAT**, localizada -10 bases del sitio de inicio de la transcripción. También llamado segmento TATA o segmento Pribnow identifica el nucleótido preciso que iniciará la transcripción⁵⁸.



Fig. 93.- Localización de la región del promotor en un gen, las regiones de flanqueo delimitan la zona del DNA que se va a transcribir. La enzima RNA polimerasa se unirá a la región del promotor, reconociendo las secuencias TTGACAT y TATA e iniciará el proceso de transcripción en organismos procaríotes.⁷⁴

La enzima RNA polimerasa de procaríotes tiene un peso de 500,000 daltons y contiene 4 subunidades, cada una con una función específica^{74,75}, como se muestra en la Fig. 94.

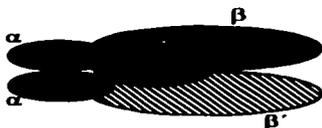


Fig. 94.- Estructura de la RNA polimerasa de Procaríotes.⁷⁶

Subunidades grandes:

- β.- Principalmente involucrada en catálisis
- β'.- Principalmente involucrada en catálisis

Subunidad Pequeña

2α

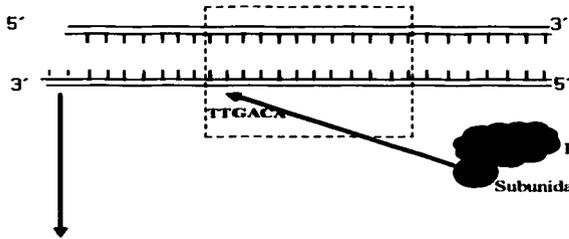
Factor sigma (Existen diferentes tipos)

- σ₇₀.- Es el comúnmente involucrado en la etapa de iniciación de la transcripción.
- σ₃₂.- Promotor de choque térmico
- σ₅₄.- Regulación por Nitrógeno

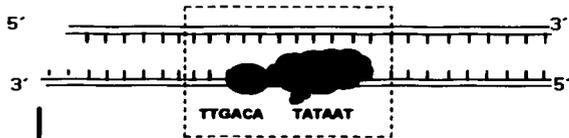
El mecanismo de transcripción en procaríotes se lleva a cabo en tres etapas:

- ▶ Iniciación
- ▶ Elongación
- ▶ Terminación

I. INICIACIÓN



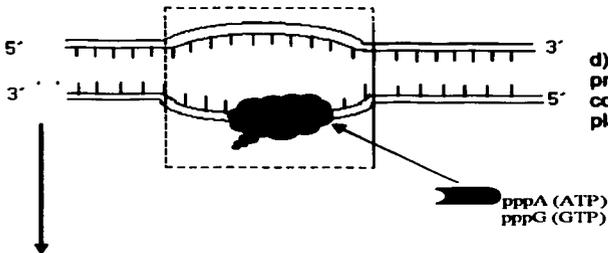
a) La subunidad sigma de la enzima RNA polimerasa reconoce la secuencia de nucleótidos de la región -35 (TTGACA) y se une a esta en la cadena de DNA en dirección 3' - 5' ^{75,84}.



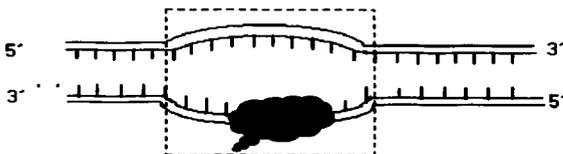
b) La enzima se une a la cadena de DNA en el sitio promotor y reconoce la segunda secuencia de consenso (Segmento Pribnow- TATAAT), ésta, identificará el nucleótido que iniciará la transcripción ⁷⁵.



c) Se libera la subunidad sigma (σ), y la cadena se abre.



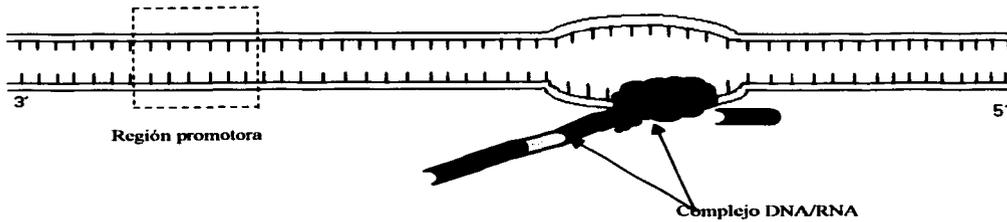
d) Comienza la inserción de nucleótidos. El primero será ATP ó GTP, la dirección será contraria a la de la cadena que sirve como plantilla, es decir 5' - 3' ⁸⁴.



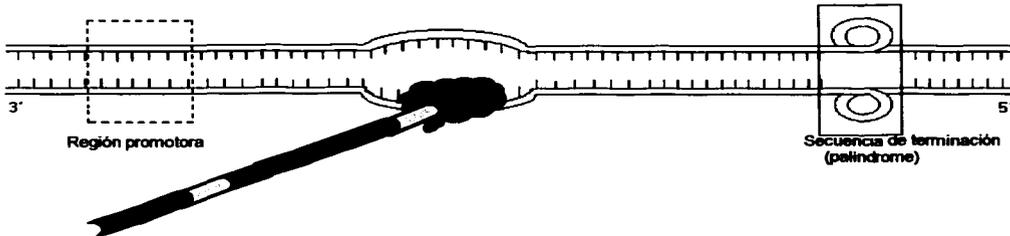
e) El primer nucleótido es incorporado ⁸⁴.

II. ELONGACIÓN

- a) La cadena de RNA crece en dirección 5'-3', la enzima continua la elongación a una velocidad de 50 nucleótidos / seg a 37° C ⁷⁵.



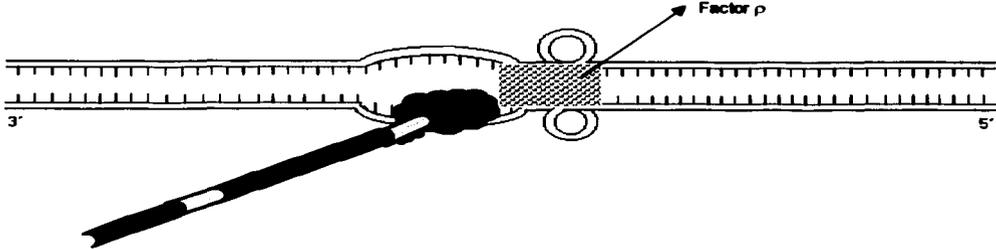
- b) La RNA polimerasa se va moviendo a lo largo de la cadena de DNA para continuar la síntesis de RNA hasta que llega a la secuencia de terminación, que es palindrómica ⁸⁴.



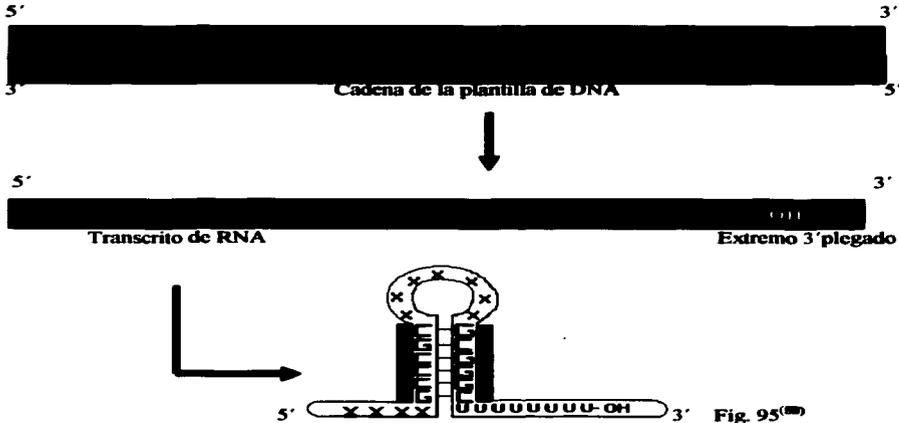
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

III. TERMINACIÓN

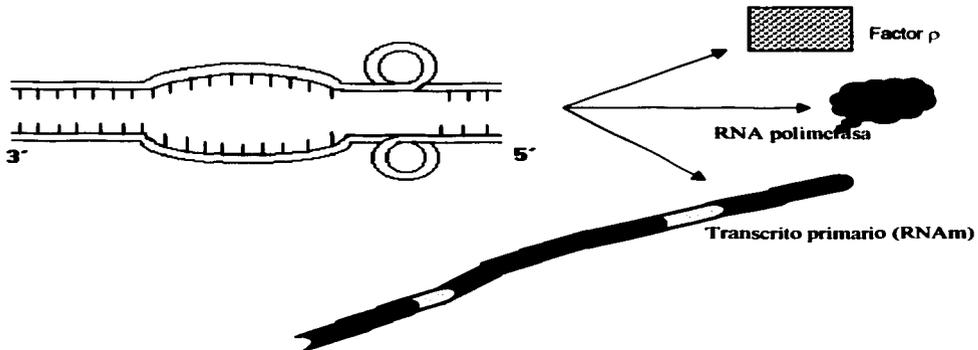
- a) La enzima alcanza la secuencia de terminación y en algunos casos un factor de terminación (Factor ρ) interactúa con el RNA recién formado ⁷⁵. Ver Fig. 95.



En la mayor parte de los casos la polimerasa puede detener la transcripción y liberar la cadena de RNA sin factores adicionales, los sitios de terminación independientes de ρ poseen una secuencia notablemente similar en la región precedente al sitio de conclusión. Esta región incluye dos tramos de pares G-C dispuestos en forma de un par repetido invertido seguido por una hilera de adeninas en la cadena transcrita. Como consecuencia de esta simetría en su secuencia de bases, se asume que el extremo 3' del RNA nascente forma una horquilla que impide el avance de la enzima. Los datos indican que la polimerasa se detiene cuando llega a esta región. Se cree que el tramo de nucleótidos del DNA que contiene adenina facilita la liberación de la cadena de RNA, puesto que los pares de bases formados entre el Uracilo de una cadena del RNA y la Adenina de la cadena de DNA son especialmente débiles ⁸⁸.



b) Por medio de un proceso de hidrólisis se separan la RNA polimerasa y el factor ρ , dejando libre al transcrito primario ^{75,84}.



En la célula, la función del factor Rho depende de la presencia de una proteína monomérica de 21 KDa llamada NusG. Este se une tanto a la RNA polimerasa como a ρ aunque no se sabe aún si se une simultáneamente. Suponiendo que así sea, implicaría que puede actuar acercando al factor ρ al transcrito naciente o estabiliza al complejo ρ -transcrito naciente-RNA polimerasa. Por lo que la importancia biológica de este factor en organismos bacterianos es fundamental para el proceso transcripcional ⁹⁴.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2.6.1.2 Transcripción en Eucariotes

El proceso de transcripción en eucariotes es un poco más complicado, empezando con que existen tres RNA polimerasas ⁷⁵:

RNA polimerasa I.- Cataliza la producción de RNAr

RNA polimerasa II.- Cataliza la producción de RNAm

RNA polimerasa III.- Cataliza la producción de RNAt, RNA5S, y RNAsn

Las tres enzimas son complejas y tienen muchas subunidades, algunas de ellas son comunes a las tres, como se muestra en la siguiente tabla ⁷⁶:

Tabla 2. Subunidades de RNA polimerasas Eucarióticas⁷⁶

Pol I (A)	Pol II (B)	Pol III (C)
<i>Núcleo</i>		
A190 A135 AC40 AC19	B220 B150 B44(2)	C160 C128 AC40 AC19
<i>Comunes</i>		
ABC27(2), ABC23, ABC14,5, ABC α , ABC β		
<i>Específicas</i>		
A49 A43 A34.5 A14 A12.2	B32 B16 B12.6 B12.5	C82 C53 C37 C34 C31 C25 C11

La RNA polimerasa I está localizada en el nucleolo y se encarga de la síntesis de los RNAr 18S, 5S, 8S y 28S ⁸⁰.

La RNA polimerasa II, localizada en el nucleoplasma se encarga de la síntesis de los RNAmn, es decir, los precursores de los RNAm ⁸⁰. No puede unirse a un promotor por sí misma; por ello, necesita otros factores proteínicos que se unen en un orden específico al promotor e interactúan con

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

la RNA polimerasa II para transcribir de manera eficiente. Los factores de transcripción y sus características se describen a continuación ⁷⁷.

1. **TFIID**.- Se une a la secuencia TATA, está compuesto de la proteína de unión al segmento TATA (TAP) y por más de otras ocho subunidades.
- 2.- **TFIIA**.- Estabiliza la unión de TFIID, evita que factores inhibidores deshagan el complejo TFIID.
- 3.- **TFIIB**
- 4.- **TFIIF – RNA**.- Complejo Polimerasa II
- 5.- **TFIIE, TFIIH, TFIIF**.- Factores que se deben añadir en este orden para que la transcripción se lleve a cabo.

Se cree que la RNA polimerasa II y sus factores asociados forman grandes complejos multifuncionales llamados transcriptosomas, dentro de los cuales se coordina la biosíntesis del RNAm ⁹². Estudios recientes describen que hay una fuerte relación entre la estructura de la RNA Polimerasa II y la fase de elongación. Estudios estructurales de la RNA polimerasa bacteriana y de levaduras se llevan a cabo para dilucidar estos mecanismos ya que tienen importancia en el desarrollo de tratamiento para el cáncer, SIDA e infecciones bacterianas. ⁹³.

RNA polimerasa III, localizada en el nucleoplasma, se encarga de sintetizar los RNAr 5S y los RNAm ⁹⁰, su estructura se muestra en la siguiente figura.

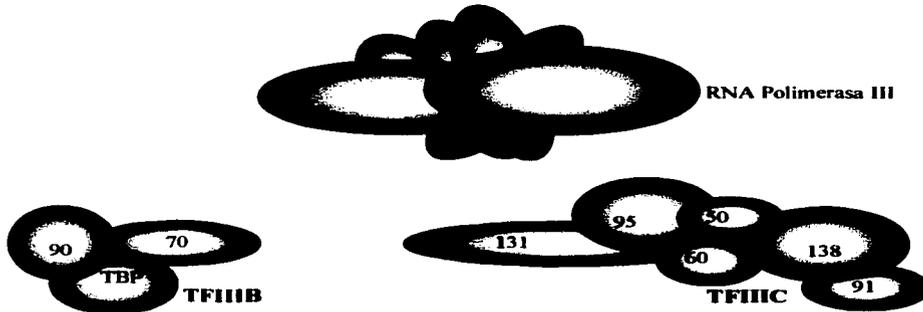


Fig. 96. Estructura de la RNA polimerasa III, que contiene múltiples subunidades, y los factores TFIIB y TFIIIC que se unen a las regiones promotoras de genes tipo III ⁷⁸.

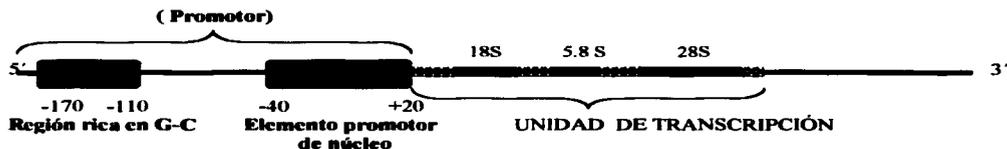
Región Promotora

Esta será de tres tipos. Dependiendo del tipo de RNA polimerasa que se usará, así pues tenemos:

- Promotores Pol I
- Promotores Pol II
- Promotores Pol III

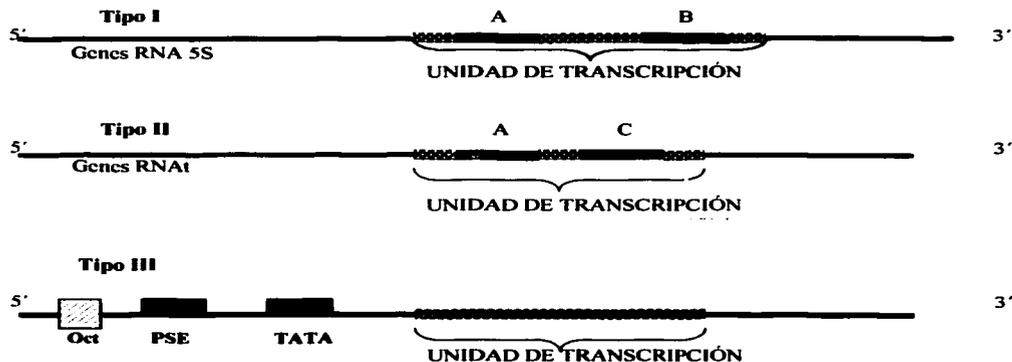
a) Promotores Pol I

Están asociados con genes para RNA ribosomal – muchas copias por genoma Tienen dos principales elementos de control: Regiones ricas en secuencias G-C y un elemento promotor de núcleo ⁷⁴.



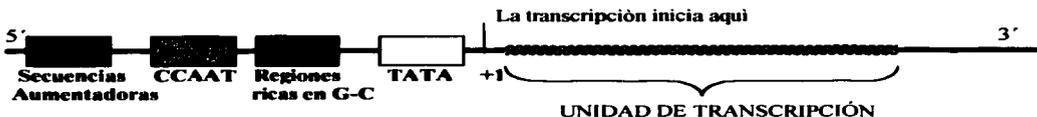
b) Promotores Pol III

Son de tres tipos, según el RNA que van a transcribir.



c) Promotores Pol II

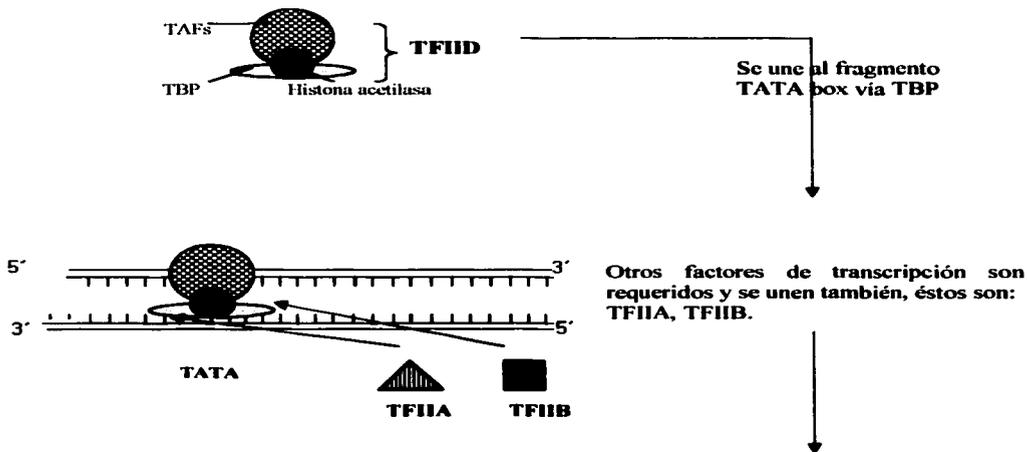
Consisten en un segmento TATA box, elementos promotores ascendentes (un fragmento CCAAT y regiones ricas en secuencias C-G), así como aumentadores⁷⁴.



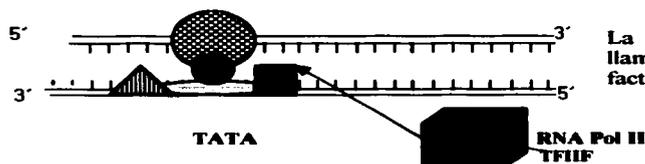
No sólo la región promotora es más compleja en el caso de eucariotes, también el proceso de transcripción es más complejo ya que además de la enzima se requieren factores adicionales, como a continuación describiremos para el caso de RNA polimerasa II⁷⁶.

I. INICIACIÓN

TFIID.- Es un factor que consiste de una proteína de enlace a TATA (TBP), TAFs, y una histona acetilasa. Este factor se enlaza al fragmento TATA box⁷⁶.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



La RNA polimerasa II es entonces llamada al sitio y llega a éste con el factor TFIIF unido a ella.

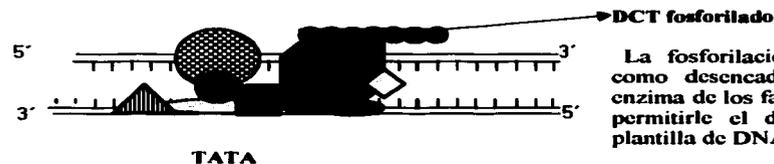


Una vez unida la enzima, habrá otros dos factores que se unen al complejo de iniciación: TFIIE y TFIIH⁷⁶.

En la subunidad más grande de la RNA polimerasa se encuentra un dominio Carboxi terminal (DCT), que constan de una secuencia de siete aminoácidos (Tir - Ser- Pro- Tre- Ser- Pro- Ser) repetida una y otra vez. De los siete aminoácidos, todos menos las dos prolinas son candidatos primarios para fosforilación mediante proteincinasas. Los estudios indican que la RNA polimerasa que ensambla el complejo inicial no está fosforilada, en tanto que la misma enzima que participa en la transcripción está intensamente fosforilada. Parece ser que la enzima es fosforilada justo antes de iniciar la transcripción, y el responsable de esto es otro factor de transcripción que actúa como proteincinasa (TFIIH)^{58,76}.



TFIIH se une y al actuar como proteincinasa fosforila a la enzima RNA polimerasa II

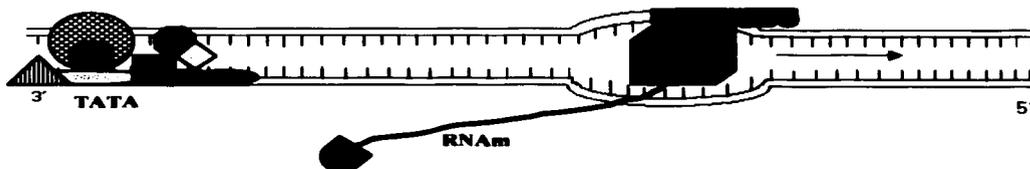


La fosforilación de la enzima actúa como desencadenante para separar la enzima de los factores de transcripción y permitirle el desplazamiento sobre la plantilla de DNA⁵⁴.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

II. ELONGACIÓN

De igual manera que el segmento Pribnow de los procariones, al cual se parece, el segmento TATA determina el sitio preciso donde inicia la transcripción y la enzima elige la secuencia que tendrá el transcrito, así insertará base por base para ir formando el RNAm correspondiente.



Varias proteínas incrementan la elongación en eucariotes. La más estudiada es un factor de transcripción llamado TFIIS que ejerce su acción cuando la RNA polimerasa II se detiene, esto sucede porque a veces la enzima encuentra una secuencia de nucleótidos que ocasiona que se detenga sobre la plantilla de DNA, interrumpiendo así el proceso de transcripción. El factor TFIIS ocasiona que la RNA polimerasa retroceda un poco, y entonces TFIIS remueve el extremo 3' del RNA, permitiendo que la enzima continúe la elongación desde el punto en donde se detuvo⁸⁴. Nueva evidencia sugiere la posibilidad de que, a través del ciclo de transcripción el DCT efectúa una serie de modificaciones covalentes y estructurales que le permiten modular las interacciones y funciones de los factores involucrados durante la iniciación, elongación y terminación de la transcripción⁹².

Al igual que en el proceso de replicación, la energía para llevar a cabo la transcripción proviene de los mismos nucleótidos. Los ribonucleótidos libres están en la forma de trifosfato. Conforme cada nucleótido se une a la creciente hebra de RNA, dos de los fosfatos se separan del nucleótido, liberando energía⁸⁴. Véase Fig. 98.

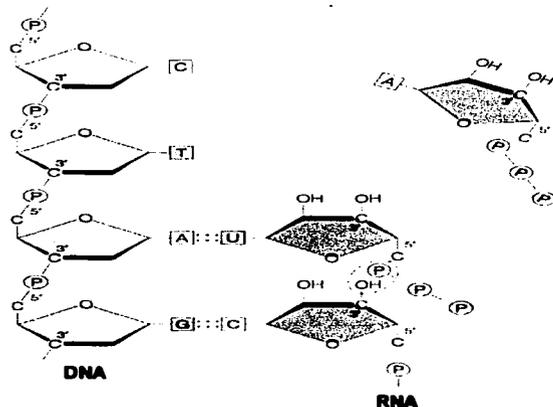


Fig. 98. Liberación de energía para el proceso de transcripción. Al unirse el nucleótido a la cadena de RNA naciente se liberan dos grupos Fosfato que aportan la energía necesaria.⁸⁴

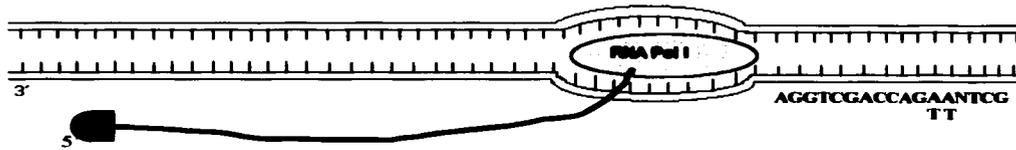
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

III. TERMINACIÓN

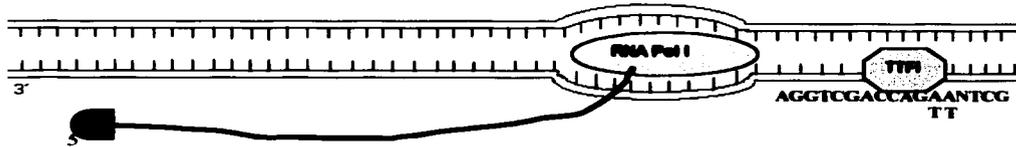
La terminación de la transcripción en genes eucariotes es más complicada que en procariontes. Por un lado, la separación del RNA en un sitio específico puede suceder antes de la terminación del proceso, así que el extremo 3' del RNA puede no representar el verdadero sitio de terminación. Por el otro lado, la terminación será diferente dependiendo de la RNA polimerasa que transcriba el gen⁸⁴. A continuación se describe cada una de las posibilidades.

RNA Polimerasa I

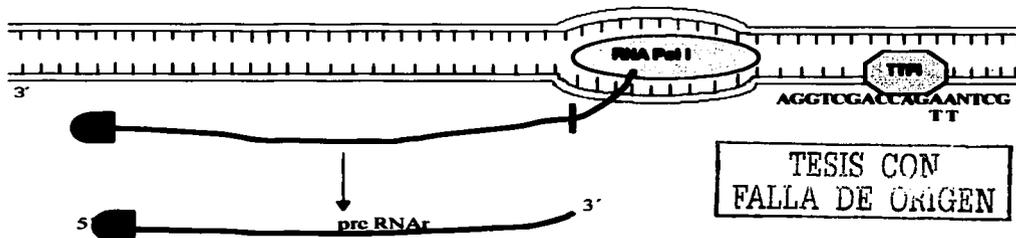
La RNA Polimerasa I transcribe copias idénticas del mismo gen (un gen que codifica para el precursor de rRNA) y tiene un sitio específico de terminación. Este sitio está caracterizado por la secuencia de consenso de 17 nucleótidos AGGTCGACCAG(A/T)(A/T)NCTCG, donde N = cualquier nucleótido.



La secuencia de consenso es reconocida por un factor de terminación (TTFI), el cual ayuda al proceso de terminación.

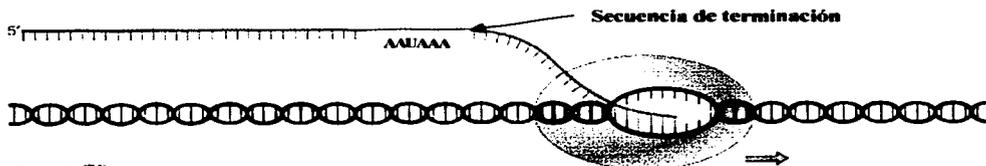


Sin embargo, el rRNA recién formado es liberado en un sitio aproximadamente 10 nucleótidos más arriba del sitio de terminación antes de que la RNA Pol I llegue a la secuencia. Por lo tanto, la secuencia de terminación no aparecerá en la molécula rRNA recién formada.

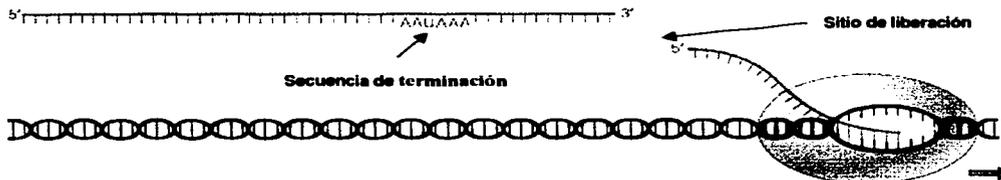


RNA Polimerasa II

Aún no se conoce bien este mecanismo en eucariotes, pero se piensa que tiene lugar cuando se presenta la señal de poliadenilación, ya que se cree que ésta parece estar ligada al evento de desdoblamiento²⁶. Ver Fig. 99a. Esta señal es la secuencia AAUAAA⁸¹.



Las moléculas de RNA transcritas generalmente se separan aproximadamente 11 – 30 nucleótidos después de esta secuencia de terminación. Ver Figura 99b. Después de la liberación, la RNA Polimerasa II continúa transcribiendo, por lo que muchos genes transcritos por esta enzima carecen de sitio de terminación. Este proceso puede terminar en cualquier lugar desde cientos a miles de nucleótidos después del sitio de liberación, pero el fragmento producido entre éstos dos se degrada subsecuentemente⁸⁴.



RNA Polimerasa III

Debido a que la RNA Polimerasa III transcribe los mismos productos *in vitro* como *in vivo*, y porque las mutaciones cerca del extremo 3' de la región transcrita alteran la terminación, la RNA Polimerasa III aparentemente reconoce un sitio específico en el gen que transcribe como sitio de terminación, pero aún no se conoce del todo⁸⁴.

Algunas consideraciones importantes sobre la transcripción.

Conforme han avanzado las investigaciones en esta área se han descubierto más factores involucrados en el proceso de transcripción y su importancia en otros procesos fisiológicos. Por ejemplo, los factores de transcripción *Knox 20* (*EGR2*), *Oct 6* (*SCIP/Tst1*) y *Sox 10* se consideran necesarios para la transición del estado no mielínico al mielínico de las células de Schwann que forman los nervios y de esta manera estos factores pueden ser marcadores que activen la regeneración nerviosa en neuropatologías ¹²⁷.

También se ha descubierto recientemente que la familia que conforma los factores de transcripción modula la expresión génica a través de interacciones proteína-proteína con otras células. Se dice que estas proteínas pueden participar en células tumorales, particularmente en invasión y metástasis por activar la transcripción de genes relacionados a la angiogénesis ¹³³.

Al igual que en otros procesos fisiológicos, existen situaciones que pueden inhibir estos mecanismos. Se ha comprobado que el estrés hipóxico regula activamente la transcripción, no sólo por la activación de genes específicos, sino también por la represión selectiva ¹²⁹.

2.7 MADURACIÓN Y PROCESAMIENTO DEL TRANSCRITO PRIMARIO

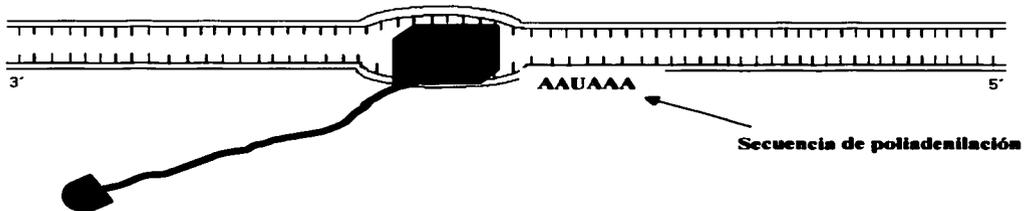
Una vez que el RNAm es transcrito a partir del DNA de alguna región de un gen, atraviesa por varias etapas de procesamiento antes de dejar el núcleo para ser traducido en el citoplasma. Este "procesamiento" involucra lo siguiente⁷³:

- ✓ La adición de una molécula de guanina modificada al extremo 5' (CAP), previamente descrita.
- ✓ La adición de una "cola" compuesta de una serie de bases adeninas llamada cola poli-A, en el extremo 3'.
- ✓ La escisión de los intrones, y
- ✓ El empalme (Splicing) de los exones para unirlos nuevamente.

2.7.1 Poliadenilación 3'

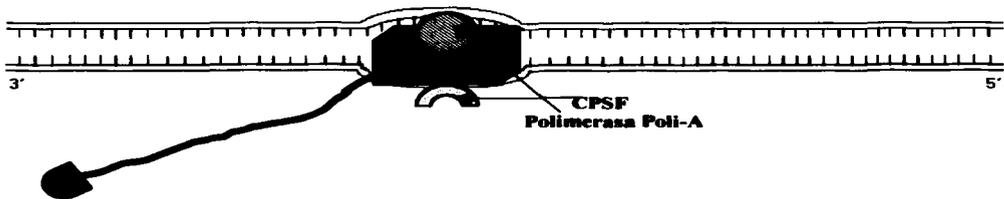
Después de que la transcripción ha pasado el sitio de liberación, el pre RNAm es liberado. Inmediatamente se añade al extremo 3' la secuencia poli-A, es una cadena de unos 200 residuos poliadenilados. Esto lo realiza una enzima, la polimerasa de Poli-A y de algunos factores que colaboran en esta tarea. Esta "cola" o residuo de poli-A desempeña las siguientes funciones⁸²:

- ✓ Interviene en la exportación del RNAm al citoplasma
- ✓ Contribuye a la estabilidad del RNAm en el citoplasma
- ✓ Sirve de señal de reconocimiento al ribosoma

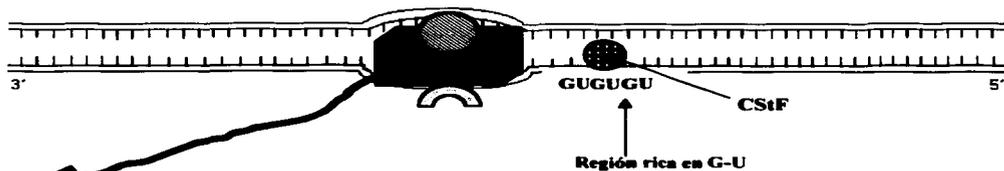


Al llegar a la secuencia de poliadenilación (AAUAAA), esta es incorporada al RNAm recién formado y junto con ésta un factor llamado Factor de Especificidad de Poliadenilación y Desdoblamiento (CPSF), así como la enzima Polimerasa Poli-A.

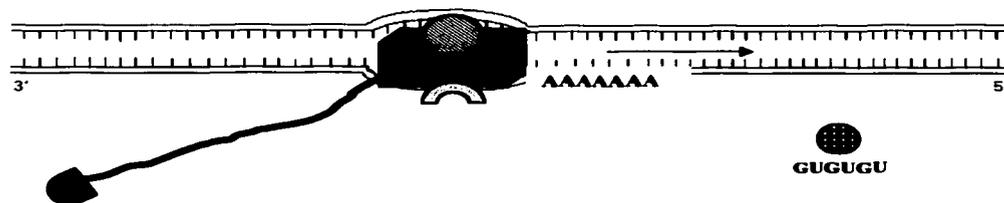
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



La enzima sigue avanzando y llega hasta una región rica en secuencias G-U, a ésta región se une otro factor llamado Factor de Estimulación de Desdoblamiento (CStF).



Al llegar la cadena naciente de RNA a esta secuencia rica en G-U unida a CStF se desprende y la enzima Poli-A polimerasa inicia la incorporación de nucleótidos Adenina. La estructura se muestra en la Fig. 100. A esto se le llama poliadenilación.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Al terminar de transcribir la "cola" de Poli-A, el RNAm naciente se desprende, así como las enzimas y los factores, la cadena de DNA vuelve a cerrarse en una doble hélice.

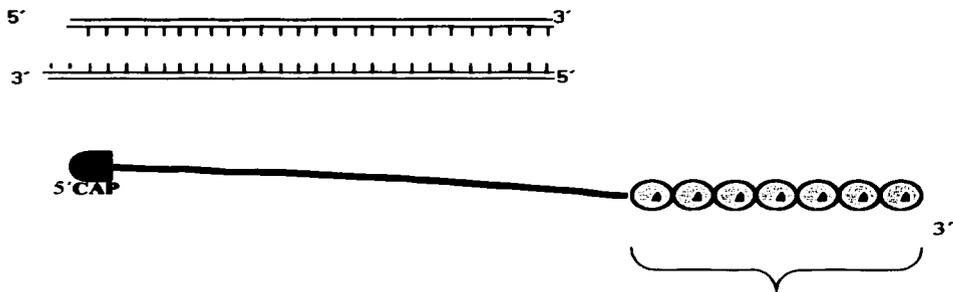
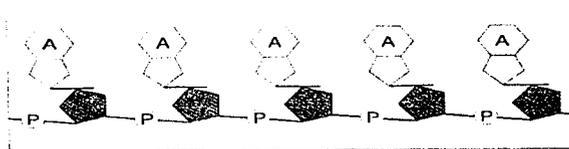


Fig. 100. Estructura de la cola poli-A del pre-RNAm.⁸⁴



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2.7.2 El mecanismo de remoción de intrones y splicing de exones

En 1977, los biólogos moleculares hicieron un importante descubrimiento, en los organismos superiores, así como en levaduras, protozoarios y el reino animal y vegetal los genes están interrumpidos. A lo largo de una secuencia de nucleótidos que codifican un polipéptido, en particular, puede haber una o más interrupciones formadas por secuencias sin codificar. En algunos genes pueden encontrarse 50 ó más de estas secuencias interpuestas o "intrones"⁶³, las secuencias que contribuyen a formar un producto RNA maduro se denominan "exones". Los intrones se observan en todo tipo de gen, incluyendo RNAt, RNAr, RNA viral y genes que codifican proteínas celulares (Fig. 101).



Fig. 101.- Composición de un transcrito primario ó pre-RNA. La información que se traduce a proteínas se encuentra en los exones, y éstos se encuentran intercalados entre los intrones o regiones que no se traducen.⁷³

Las partes de un transcrito primario que corresponden a intrones se eliminan mediante un proceso complejo conocido como "empalme de RNA o Splicing". Para empalmar un RNA se debe introducir una pausa en la cadena a nivel de los bordes 5' y 3' (sitios de desdoblamiento) de cada intrón, y los exones situados a ambos lados de los sitios de empalme deben unirse mediante enlaces covalentes⁵⁸.

Para que esto pueda ser llevado a cabo hay que considerar que en las uniones entre exones e intrones se encuentra una secuencia de nucleótidos en el RNA altamente conservada de origen evolutivo ancestral. Esta secuencia, encontrada con mayor frecuencia en el límite exón-intrón es G/GU en el extremo 5' del intrón (sitio 5' de empalme) y la AG/G en el extremo 3' del intrón (Sitio 3' de empalme). Ver Fig. 102.

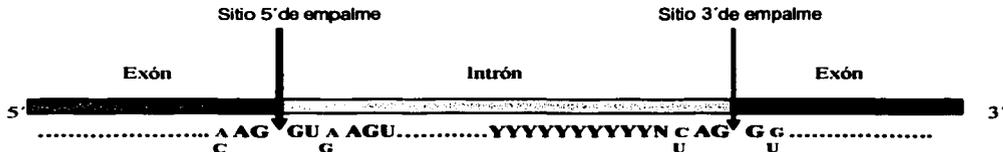


Fig. 102. Secuencias de nucleótidos en los sitios de empalme del transcrito primario.⁵⁸

2.7.2.1 Mecanismo de remoción del intrón en RNAm y empalme de Exones.

A continuación se explica con detalle este mecanismo ilustrados por las figuras 103 a, b, c, d, e, f, g, h, i.⁵⁸



Fig. 103a

1. La región del pre-RNAm que será empalmada se muestra en rojo.

2. El primero de los componentes de empalme (U1 RNAsn) se une al sitio de empalme 5' del Intrón⁸⁵.

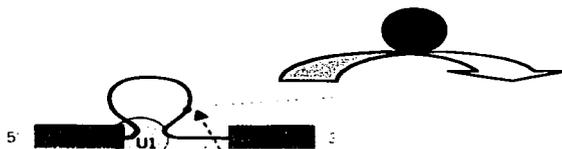
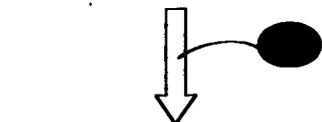


Fig. 103b



Fig. 103c

Amplificación

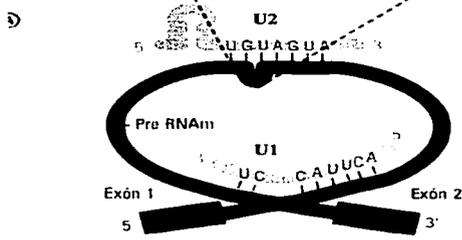


Fig. 103d

3. El siguiente factor en introducirse al complejo de empalme es U2 RNAsn⁸⁵, se enlaza al pre-RNAm de manera que un residuo de adenosina sobresale por fuera de la hélice que lo rodea (las flechas negras indican la región en el esquema general y en la amplificación, esta región será el punto de ramificación del lazo de vaquero). En la amplificación puede verse que la secuencia de nucleótidos de U1 RNAsn es complementaria al sitio de empalme 5' del pre-RNAm y muestra

que U1 se enlaza se enlaza al extremo 5' del intrón mediante la formación de un par de bases específicas entre el sitio de empalme y U1 ⁵⁸.

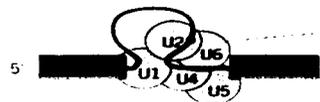
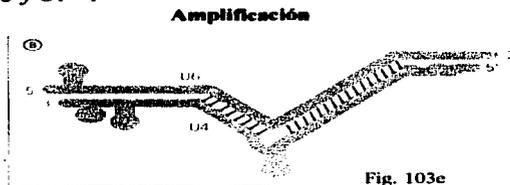
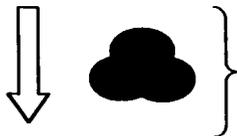


Fig. 103f

4. El enlace de U4, U6 y U5 RNAsn al pre-RNAm concluye la disposición del spliceosoma. En la amplificación se observa que a medida que forman el complejo con pre-RNAm, U4 y U6 se aparean a las bases para formar un gran número de pares ⁵⁸.

Después de su entrada al complejo, los puentes de hidrógeno entre U4 y U6 se rompen y las regiones de U6 que forman pares con U4 se convierten en pares de bases para una porción de U2 RNAsn. Se cree que U6 es una ribozima y U4 un inhibidor de su actividad catalítica ⁵⁸.

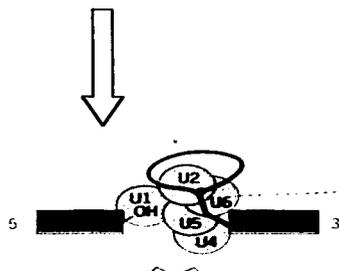
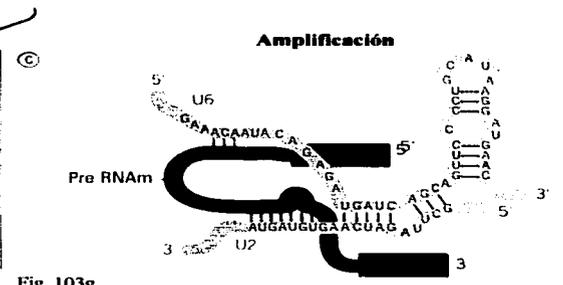


Fig. 103h

5. El ensamblado del espliceosoma va seguido del desdoblamiento del sitio de ensamblado 5', formando un exón 5' y un intrón 3' de lazo de vaquero del exón intermediario. Se cree que el exón libre 5' puede mantenerse en su sitio por su asociación a RNAsn del espliceosoma ⁵⁸.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Una vez que U4 se desplaza, U6 se encuentra en posición para efectuar los dos cortes requeridos para eliminar el intrón. También se piensa que U1 y U5 vuelven a juntar los sitios de empalme para facilitar el desdoblamiento de los enlaces a cada lado del intrón⁵⁸.

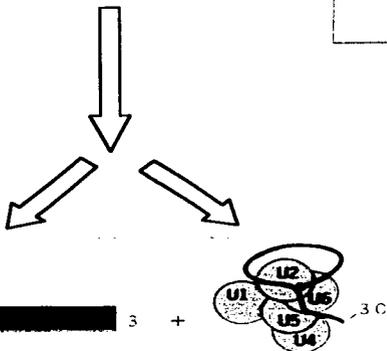
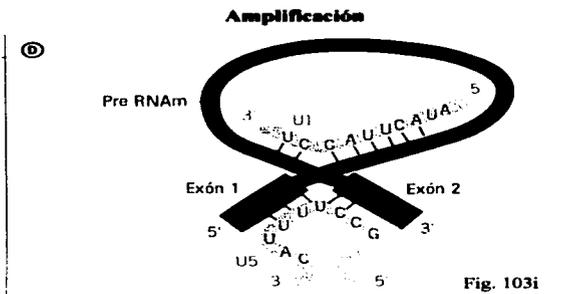


Fig. 103j



6. La primera reacción de desdoblamiento en el sitio 5' de empalme va seguida rápidamente por un segundo desdoblamiento en el sitio de empalme 3', que secciona al intrón del lazo de vaquero y simultáneamente junta los extremos de los dos exones vecinos. Luego del empalme, el RNAm tal vez se libera del pre-RNAm como partícula individual que se pueda volver a ensamblar en los sitios de otros intrones^{58,55}.

En estudios recientes sobre el espliceosoma humano, se han identificado 42 factores asociados, incluyendo 19 nuevos factores. Utilizando espectrofotometría de masas y bases de datos mejoradas, se han reportado 311 proteínas purificadas con complejos de espliceosomas. De todas las proteínas purificadas 55 contienen dominios ligados directamente a funciones en el proceso de "splicing" y en el procesamiento de RNA. También se han detectado 20 proteínas relacionadas a la transcripción, lo cual indica que hay una conexión entre este proceso y el de "splicing"⁵⁹.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

UNIVERSIDAD SALE
MEXICO

2.8 TRADUCCIÓN

La síntesis o traducción de proteínas es la actividad sintética más compleja que ocurre en la célula. En tanto que otras macromoléculas de las células se elaboran por medio de reacciones enzimáticas relativamente directas, el ensamblado de una proteína requiere todos los diferentes RNAt con sus aminoácidos unidos, ribosomas, RNA mensajeros y algunas proteínas con varias funciones, cationes y GTP⁵⁶. Generalmente se ha creído que la transcripción y la traducción del RNAm a proteínas se lleva a cabo en dos diferentes sitios celulares tratándose de células eucariotas, pero actualmente se discute la hipótesis de que la traducción también tiene lugar en el núcleo¹³⁰. Iniciaremos la descripción del organelo celular que lleva a cabo este proceso: el ribosoma.

2.8.1 Los ribosomas

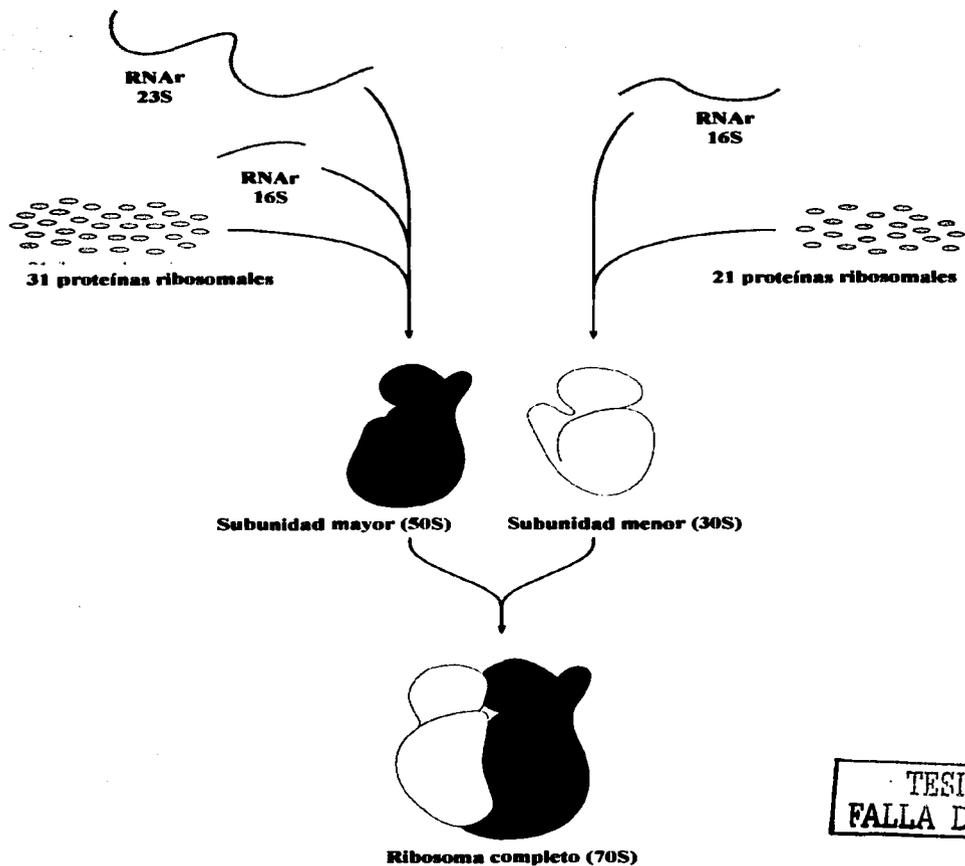
Estos organelos se presentan como cuerpos esféricos o elípticos, sin membrana limitante. Son gránulos compuestos por RNA ribosomal y proteínas⁸⁷.

El número real de RNAr y proteínas así como el tamaño final de ribosoma intacto varía según la especie. Así, por ejemplo, los ribosomas de mamíferos están compuestos de cuatro RNAr y aproximadamente 80 proteínas, mientras que los ribosomas de *E. coli* están compuestos de tres RNAr y 52 proteínas, como se muestra en las figuras 104a y 104b. Aunque hay mucho más proteínas que RNAr en el ribosoma, los RNAr son mucho más grandes que las proteínas y constituyen generalmente el 60% de la masa ribosomal. Antes de la traducción, los RNAr se conforman en las dos estructuras llamadas subunidades⁸⁴. Cada ribosoma está constituido por dos subunidades, denominadas mayor y menor, o pesada y ligera. El tamaño de las subunidades se establece, en general, en función de la velocidad con la cual sedimentan en un campo centrífugo. La unidad que expresa esa velocidad es el Svedberg, y depende no sólo del tamaño de la partícula sino también de su forma y densidad, y del medio en que está suspendida⁸⁷. Evidencias recientes demuestran que algunas de las proteínas ribosomales participan también en el proceso de transcripción, aportando pruebas de que las dos actividades principales que conducen a la expresión genética comparten proteínas¹³².

El ribosoma de *E. coli* ha sido el más estudiado y es el representante de los ribosomas procarióticos. El ribosoma intacto tiene un valor Svedberg de 70S y consiste de una subunidad grande 50S y una subunidad menor 30S. La subunidad mayor contiene dos RNAr: un RNAr 23S (2904 nucleótidos) y un RNAr 5S (120 nucleótidos), junto con 31 proteínas. La subunidad menor contiene un solo RNAr 16S (1541 nucleótidos) y 21 proteínas. Cada subunidad tiene una forma tridimensional específica (Fig. 104a) que les permite interactuar entre sí⁸⁴.

El ribosoma de mamífero se encuentra entre los mejores caracterizados de organismos eucarióticos. El ribosoma intacto tiene un valor Svedberg de 80S con una subunidad mayor 60S y una menor 40S. La subunidad mayor contiene tres RNAr: un RNAr 28S (4718 nucleótidos), un RNAr 5.8S (160 nucleótidos), y un RNAr 5S (120 nucleótidos). La subunidad ligera contiene un RNAr 18S (1874 nucleótidos) (Ver Fig 104b). El número de proteínas en ribosomas eucarióticos varía según la especie, pero de aproximadamente 45 – 50 en la subunidad mayor y de 30-35 en la subunidad menor⁸⁴.

Durante la traducción, varios ribosomas se unen uno detrás de otro sobre un RNAm y proceden a la traducción como una cadena de ribosomas, cada ribosoma traduce una polipéptido. A este complejo de ribosomas sobre el RNAm se le llama Polisoma. (Ver Fig. 105)⁸⁴.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Fig. 104a. El ribosoma de *E. coli* como representante del ribosoma de procariotes.⁴⁴

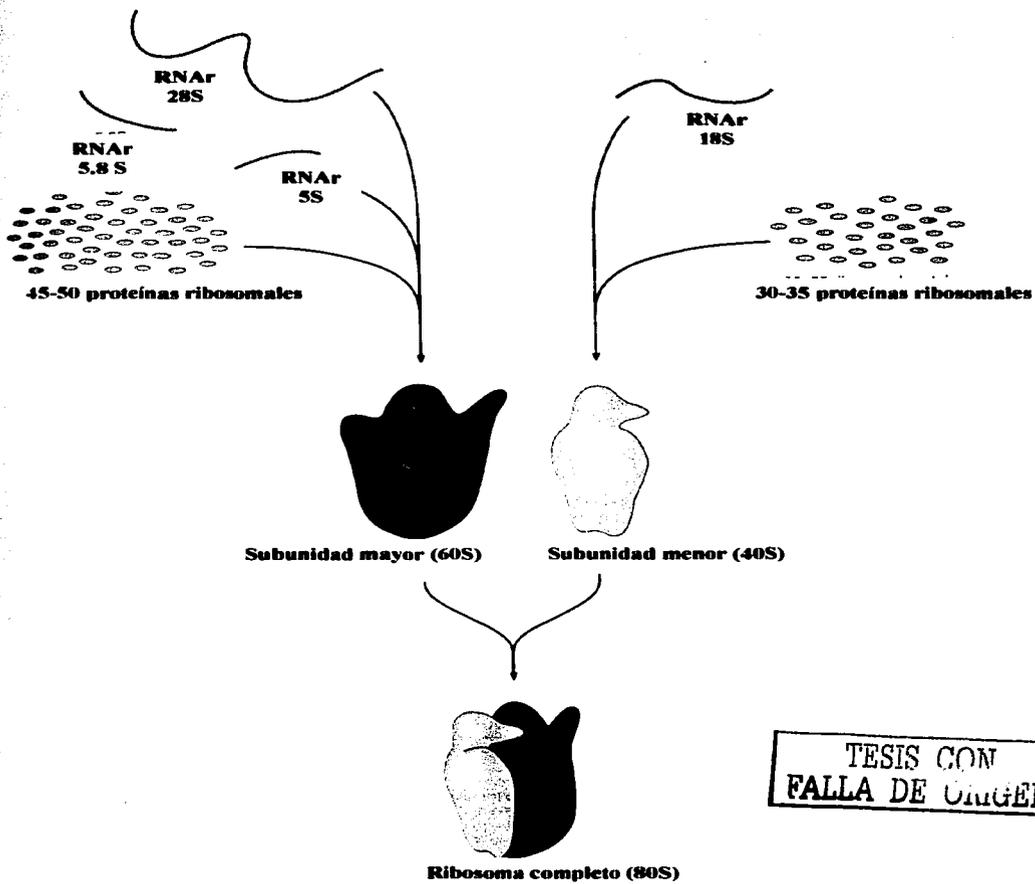


Fig. 104b. El ribosoma de mamífero como representante del ribosoma eucariótico.²⁴

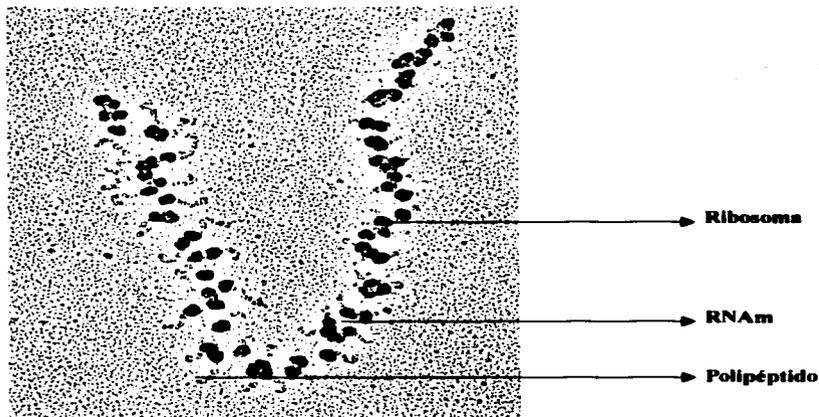


Fig. 105. Microfotografía electrónica mostrando un polisoma eucariótico, conformado de múltiples ribosomas traduciendo un solo RNAm, la cadena polipeptídica crece a medida que los ribosomas se mueven sobre el RNAm.⁸⁴

2.8.2 El Código Genético

El código genético consiste en 61 codones para aminoácidos y 3 codones de terminación, que detienen el proceso de traducción. El código genético es por lo tanto redundante, en el sentido que tiene varios codones para un mismo aminoácido, (ver Tabla 3). Por ejemplo, la glicina es codificada por los codones GGU, GGC, GGA y GGG. Si un codon muta, por ejemplo de GGU a CGC, se especifica el mismo aminoácido⁸⁵.

EL Código Genético es actualmente uno de los axiomas de la genética. Ha sido confirmado en miles de estudios y es casi universal entre todas las especies. Sin embargo, la comparación de la secuencia del DNA de varios genes con la secuencia de aminoácidos en las proteínas resultantes han revelado un número de excepciones en el código genético. Éstas parecen deberse a modificaciones específicas en los nucleótidos del RNAm después de que es transcrito, un proceso llamado "Edición del RNAm". Para casi todos los genes, la secuencia del RNAm corresponde a la secuencia del DNA que lo codificó. Sin embargo, para algunos genes, la edición del RNAm ocasiona que un nucleótido o dos difieran entre la secuencia de RNAm y la correspondiente secuencia del DNA, pero esto se debe a la edición del RNAm y no a un error en el código genético. Cabe mencionar que hay otras excepciones que no pueden ser explicadas por este proceso de "edición", indicando que el Código Genético no es completamente universal, aunque estas excepciones tanto como las anteriormente descritas son poco frecuentes⁸⁴.

Tabla 3. El Código Genético ²¹²

	U	C	A	G	
U	UUU Fenilalanina UUC Fenilalanina UUA Leucina UUG Leucina	UCU Serina UCC Serina UCA Serina UCG Serina	UAU Tirosina UAC Tirosina UAA Codon de Terminación UAG Codon de Terminación	UGU Cisteína UGC Cisteína UGA Codon de Terminación UGG Triptófano	U C A G
C	CUU Leucina CUU Leucina CUA Leucina CUG Leucina	CCU Prolina CCC Prolina CCA Prolina CCG Prolina	CAU Histidina CAC Histidina CAA Glutamina CAG Glutamina	CGU Arginina CGC Arginina CGA Arginina CGG Arginina	U C A G
A	AUU Isoleucina AUC Isoleucina AUA Isoleucina AUG Metionina (codon iniciación)	ACU Treonina ACC Treonina ACA Treonina ACG Treonina	AAU Asparagina AAC Asparagina AAA Lisina AAG Lisina	AGU Serina AGC Serina AGA Arginina AGG Arginina	U C A G
G	GUU Valina GUC Valina GUA Valina GUG Valina	GCU Alanina GCC Alanina GCA Alanina GCG Alanina	GAU Ac. Aspártico GAC Ac. Aspártico GAA Ac. Glutámico GAG Ac. Glutámico	GGU Glicina GGC Glicina GGA Glicina GGG Glicina	U C A G

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

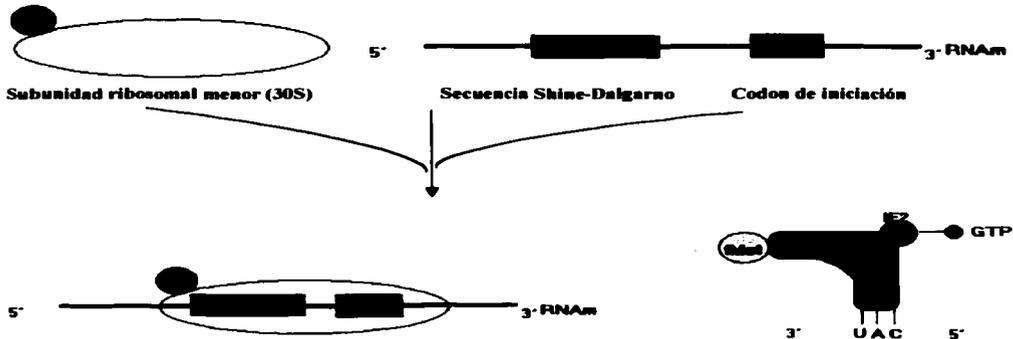
2.8.3 Traducción de la Información Genética en Procariotes

La síntesis de una cadena de polipéptidos se puede dividir en tres actividades distintivas: inicio, alargamiento y terminación de la cadena. Se analizará por separado cada etapa.

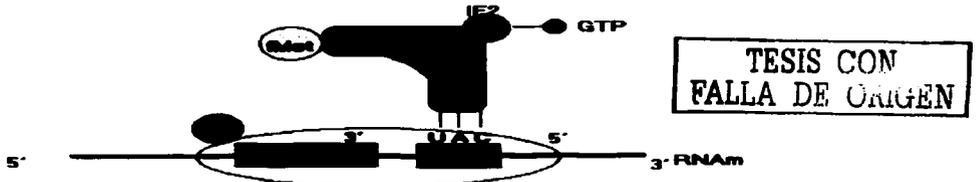
I. INICIACIÓN

1. Antes de iniciar la traducción Las dos subunidades ribosomales deben separarse, esta separación es facilitada por un factor de iniciación protéinico llamado IF1.

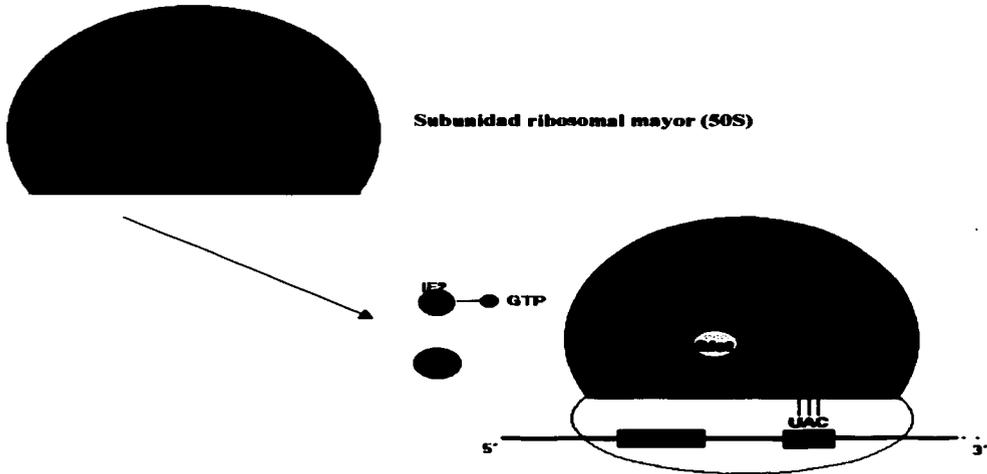
2. La unidad ribosomal menor (30S) se une a la secuencia de iniciación en el RNAm con la ayuda del factor de iniciación 3 (IF3). Este complejo se une a una secuencia de iniciación cerca del extremo 5' del RNAm. La secuencia de iniciación en el RNAm tiene dos importantes secuencias conservadas. La primera es el codon de iniciación, generalmente AUG, pero menos frecuente GUG ó UUG. La segunda es una secuencia de seis nucleótidos localizada aproximadamente a seis nucleótidos antes del codon de iniciación, esta secuencia es llamada la secuencia Shine-Dalgarno ^{84,88}.



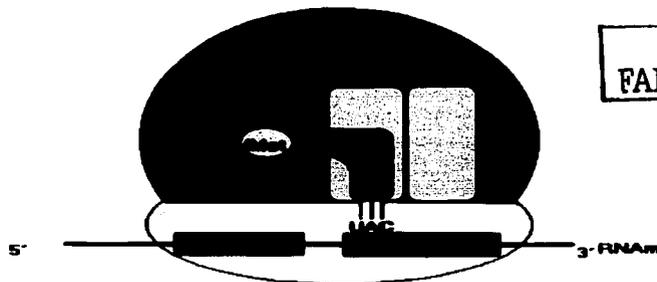
3. Un iniciador RNAt cargado con el aminoácido N-formil metionina se une a otro factor IF2, y se alinea en la subunidad menor, donde su anticodón se aparea con el codon de iniciación ^{88,84}.



4. La subunidad ribosomal mayor se une al complejo para formar el ribosoma completo. Se liberan los factores de iniciación IF2 e IF3. La energía para este proceso se deriva de la hidrólisis de GTP^{58,84}.



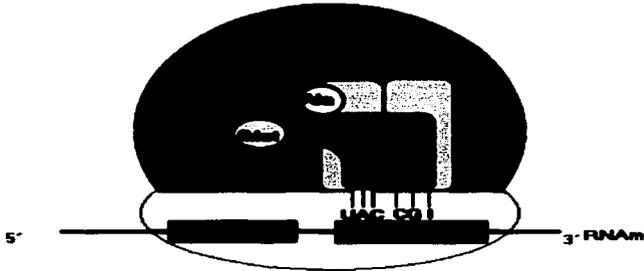
Para comprender el proceso de elongación es necesario saber que el ribosoma completo tiene dos sitios que pueden dar cabida a RNAt: El Sitio A (Aminoacil o sitio de entrada), y el sitio P (Peptidil o sitio donador). El ribosoma se ensambla sobre el RNAm con el sitio A orientado hacia el extremo 3' del RNAm y el sitio P orientado hacia el extremo 5'. Durante la iniciación, los tres nucleótidos del codón de inicio (AUG) se alinean en el sitio P, donde se aparean con el anticodón en el RNAt iniciador^{84,58}.



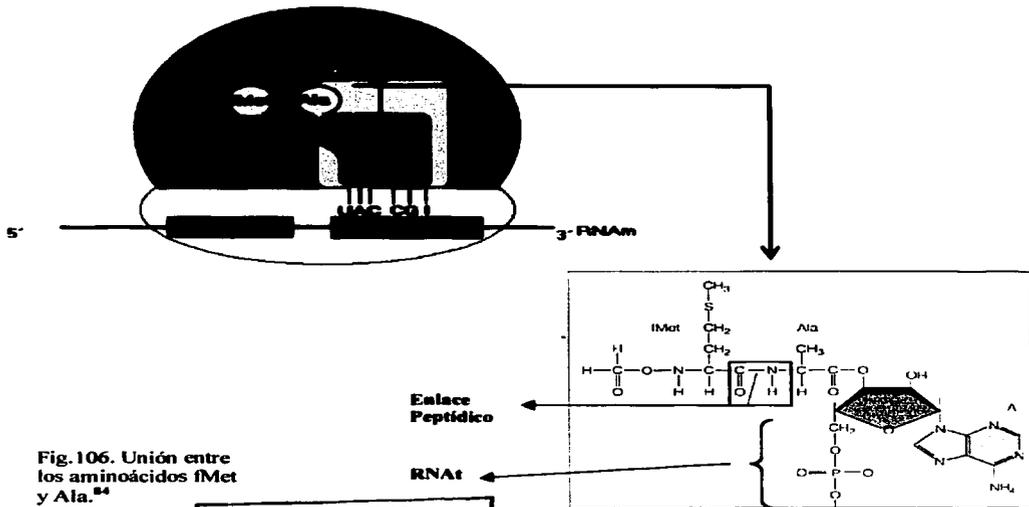
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

II. ELONGACIÓN

1. Cuando la elongación inicia, el sitio P del ribosoma está situado sobre el codon de iniciación y el sitio A sobre el segundo codon en el RNAm. El RNAt correctamente cargado (en el ejemplo se muestra un RNAt alanina) entra en el sitio A, después de unirse al factor EF-Tu y GTP; y su anticodon se aparea con el segundo codon ^{58,84}.

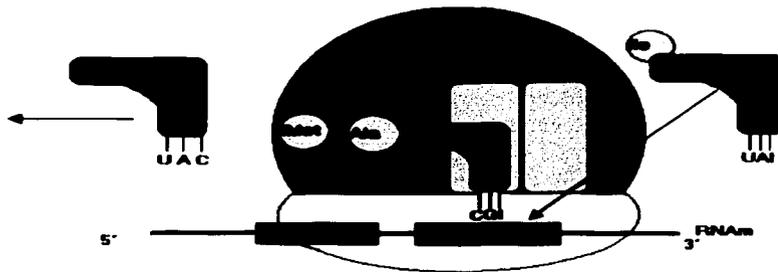


2. El enlace entre la N-formil metionina y su RNAt se rompe cuando esta se une al extremo amino del segundo aminoácido via un enlace peptídico. El extremo carboxilo del segundo aminoácido permanece unido a su RNAt, como se muestra en la ampliación (Fig. 106). Este enlace peptídico es catalizado por la enzima Peptidil Transferasa. Esta enzima no es libre en la célula sino que forma parte de la subunidad ribosomal 50S.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

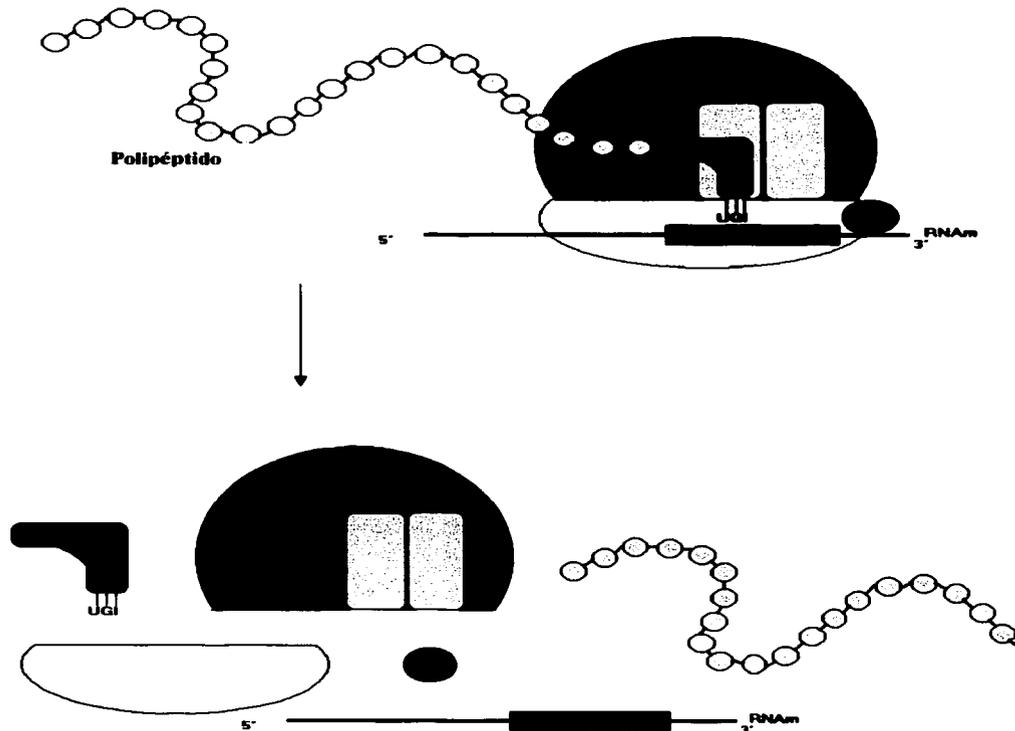
3. La formación del enlace peptídico libera al RNAt en el sitio P de su amino ácido. El ribosoma se mueve entonces exactamente tres nucleótidos a lo largo del RNAm, expulsando el RNAt descargado del sitio P al mismo tiempo que el RNAt cargado que ocupaba el sitio A pasa al sitio P. Este proceso se conoce como *Traslación*. Este proceso requiere de otro factor, EF-G, el cual forma un complejo con GTP cuando interactúa con el ribosoma. Durante la traslación, el GTP es hidrolizado a GDP, liberando energía, y el complejo GDP-EF-G es liberado del ribosoma^{84,88}.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

III. TERMINACIÓN

1. El sitio A se posiciona sobre el codon de terminación (UAG), otros codones de terminación son UAA y UGA. Ninguno de estos codones codifica para un aminoácido y no hay RNAt con anticodones complementarios a estos codones (con excepción de algunos RNAt mutantes muy raros). El factor de terminación RF1 o RF2 catalizan el proceso. RF1 lo hace para los codones UAA y UAG, RF2 cataliza la reacción para el codon UGA. Se libera el enlace que mantiene al último aminoácido incorporado en el sitio P y con ello se libera la cadena polipeptídica del ribosoma. Las dos unidades se separan, liberando al ribosoma del RNAm ^{58,84}.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

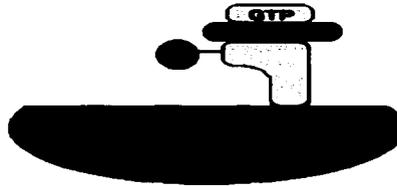
2.8.4 El Proceso de Traducción en Eucariotes

I. INICIACIÓN

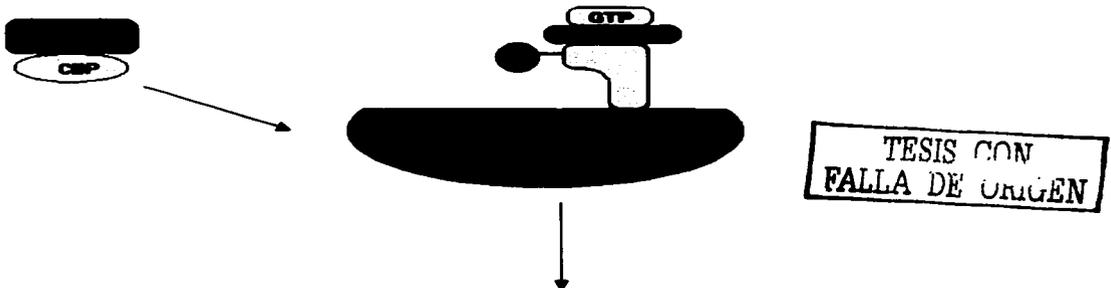
1. El RNAt iniciador está cargado con metionina, pero difiere de su homólogo procariótico en que la metionina no está formilada. La etapa de iniciación comienza con la unión del RNAt-metionina a GTP y a un factor de iniciación proteico llamado eIF2^{50,54}.

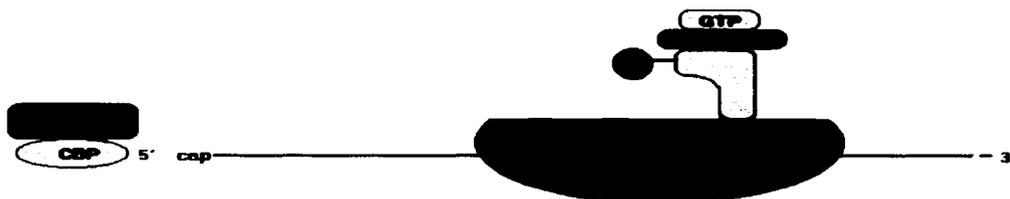
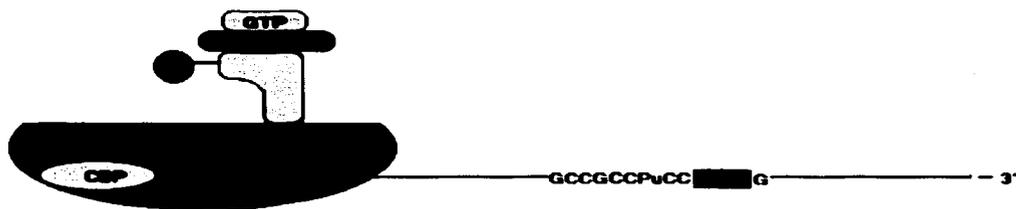


2. Este complejo se une a la subunidad ribosomal menor.

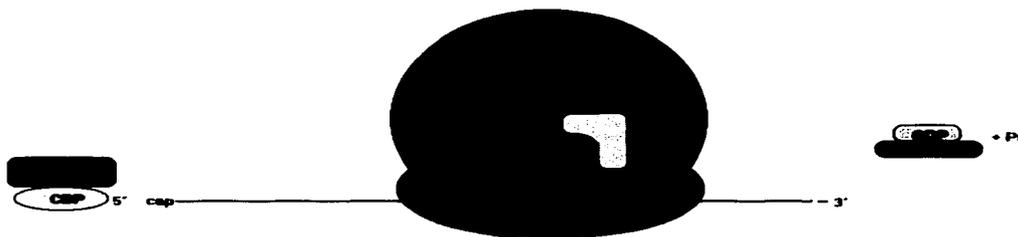


3. Este complejo (Unidad ribosomal menor-RNAt-Met-GTP-eIF2) se une al CAP en el extremo 5' del RNAm con la ayuda de otro factor de iniciación, eIF4A, que incluye una proteína de enlace a CAP que reconoce a éste en el extremo 5'.





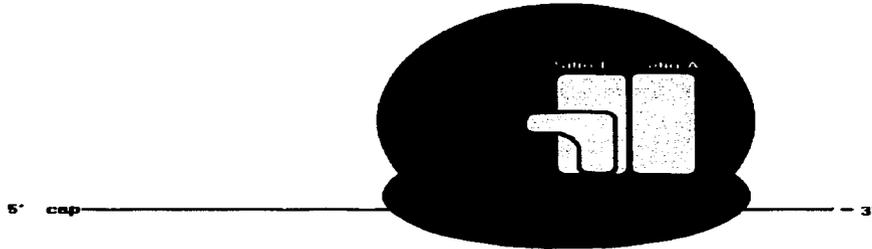
5. Una vez que el ribosoma alcanza el codon de iniciación, el anticodon RNAt-Met se aparea con el codon de iniciación, y la subunidad ribosomal mayor se una a la menor para formar el complejo RNAm-ribosomal intacto. En el proceso, se liberan los factores de iniciación y el GTP es hidrolizado a GDP generando la energía necesaria para esta etapa ^{58,84}.



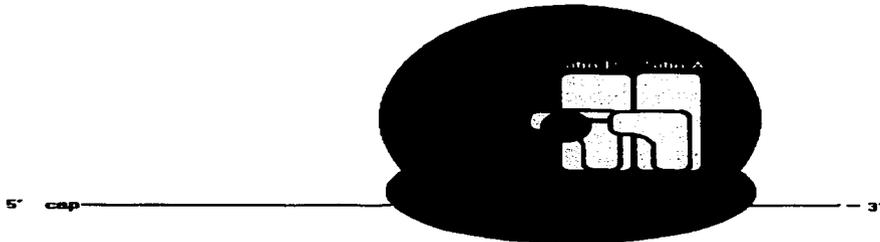
NOTA.- Como moléculas de señalización, los aminoácidos esenciales ocasionan cambios en la fosforilación y, por lo tanto, alteran la función de un gran número de proteínas que regulan la etapa de iniciación de la traducción del RNAm. Por lo que un aporte completo de estos aminoácidos es prerequisite para el mantenimiento de niveles óptimos de síntesis de proteínas en diferentes células eucariotas ¹³¹.

II. ELONGACIÓN

1. RNAt-Met, apareado al codon de iniciación, ocupa el sitio P, posicionando el sitio A sobre el segundo codon; donde entra el siguiente RNAt cargado.

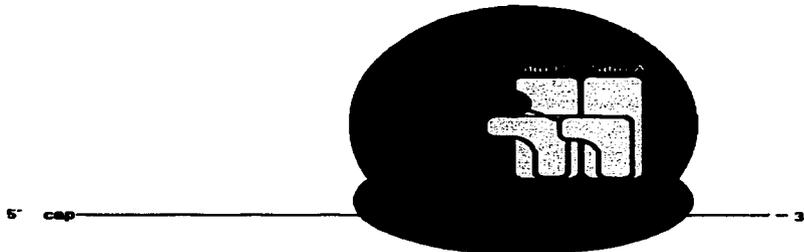


2. El RNAt cargado con el siguiente aminoácido (Glicina en este caso) entra al sitio A con la ayuda de un factor de elongación (eEF1), a su vez este requiere la hidrólisis de una molécula de GTP para completar esta función^{84,58}.

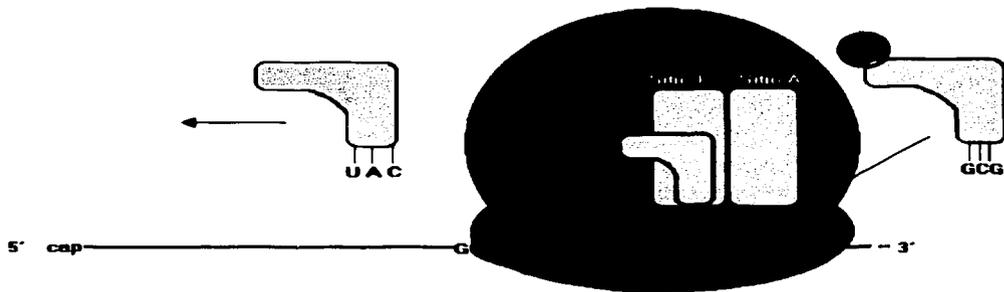


Los dos aminoácidos se unen por acción de la peptidil transferasa.

3.



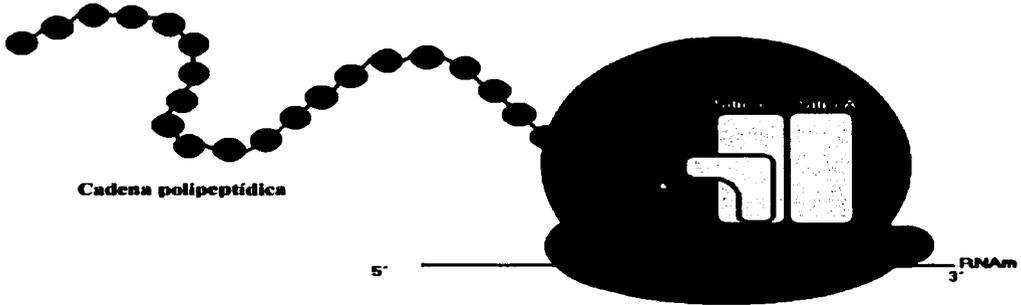
4. Otro factor de elongación, eEF2 asiste en la función de traslocación del ribosoma, lo que también requiere de una molécula de GTP^{56,54}.



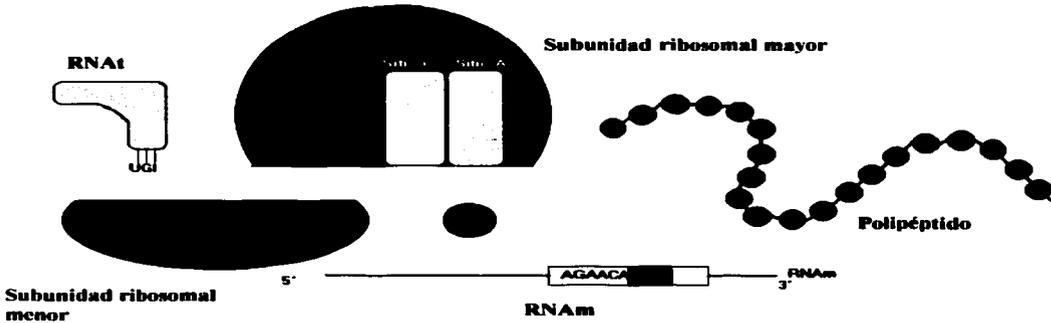
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

III. TERMINACIÓN

1. El sitio A se coloca en el codón de terminación (UAA ó UAG ó UGA), con la ayuda del factor eRF.



2. El enlace que mantiene al último aminoácido incorporado unido al sitio P se rompe y la cadena polipeptídica recién formada es liberada, las subunidades ribosomales se separan al igual que el factor eRF y de este modo el ribosoma se libera del RNAm ^{58,84}.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2.9 Regulación de la Expresión Génica en Procariotes.

Todas las células presentan mecanismos para regular la expresión de los genes. De esta manera, las células procariotas y eucariotas, sintetizan en cada momento solamente aquellos elementos que necesitan. En 1961, Francois Jacob y Jaques Monod del Instituto Pasteur de París propusieron un modelo denominado operón para la regulación de la expresión génica en bacterias, el cual se muestra en la Fig. 107⁹⁸.



Fig. 107. Organización de un operón bacteriano.⁹⁸

Un operón bacteriano típico consta de dos clases de genes:

- a) Los genes estructurales, que codifican enzimas por sí mismos. Se sitúan de ordinario adyacentes entre sí y una RNA polimerasa se desplaza de un gen estructural al siguiente, transcribiendo todos los genes a un solo RNAm.
- b) Un gen regulador (R) que codifica a una proteína represora, que puede encontrarse en la forma activa o inactiva y es el agente que controla materialmente la expresión⁹⁸.

Existen además dos regiones que intervienen en la regulación:

- El promotor (P) es el sitio activo donde la polimerasa de RNA se une al DNA antes de iniciar la transcripción.
- El Operador (O), que posee una secuencia reconocida por la proteína represora activa⁹⁸.

La clave para la expresión del operón estriba en el represor. Cuando el represor se enlaza al operador, el promotor queda protegido de la polimerasa, y la transcripción de los genes estructurales se interrumpe, véase Fig. 108. Si el represor puede enlazarse o no al operador depende de la forma de dicho represor, la cual, a su vez, depende de la presencia o ausencia de un compuesto clave en la vía metabólica, como lactosa o triptófano. La concentración de esta sustancia metabólica clave determina si el operón es activo o inactivo en cualquier momento dado.

Existen dos clases de operones según sea su respuesta a las condiciones ambientales: los operones inducibles y los operones represibles. Para el primer tipo de operones se toma como ejemplo el metabolismo de la lactosa en *Escherichia coli*, que es el más conocido⁹⁹.

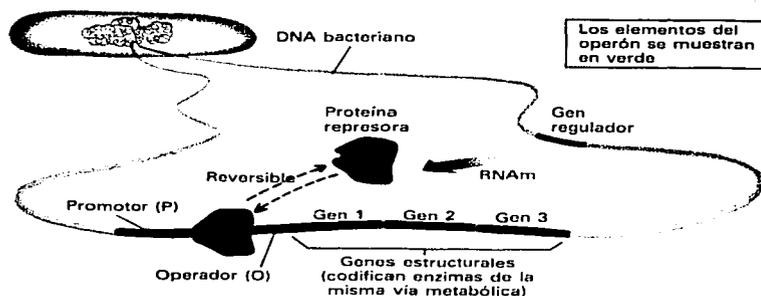


Fig. 108. Esquematación General de la acción reversible de la proteína represora sobre el operador (O).⁵⁸

2.9.1. Operón Inducible: El Operón Lac.

Cuando una bacteria se encuentra en un ambiente donde puede disponer de lactosa, los genes que hacen posible la utilización de este azúcar por la bacteria se inducen. Estos genes, agrupados en el operón de la lactosa, están constitutivamente reprimidos porque a la región del operador se ha unido una proteína represora que impide el paso de la RNA polimerasa. Cuando hay lactosa en el medio de crecimiento, alguna molécula de este azúcar puede llegar al interior de la célula usando alguno de los sistemas de transporte presentes en la membrana bacteriana para azúcares. Una vez en el interior de la célula, la lactosa puede unirse a la proteína represora unida a la región del operador; de suerte que, cuando la lactosa está unida, la proteína represora se separa de la región operadora permitiendo el paso de la RNA polimerasa y la transcripción de los genes correspondientes. Este mecanismo se muestra en la Fig. 109. cuando disminuye la concentración de lactosa en el medio, la proteína represora queda libre de nuevo, por lo que puede volver a unirse al operador del operón; impidiendo de nuevo la transcripción de los genes que lo forman⁵⁹.

2.9.1.1 Control de la Expresión del operón Lac.

EL represor *lac* ejerce su influencia mediante control negativo, puesto que la interacción del DNA con esta proteína inhibe la expresión del gen. El operón lac también se encuentra bajo control positivo, por medio del denominado "efecto glucosa". Cuando se suministra glucosa a las células bacterianas y también algunos otros tipos de sustratos, como lactosa o galactosa, las células metabolizan la glucosa e ignoran los otros compuestos. La glucosa en el medio actúa para suprimir la producción de diferentes enzimas catabólicas, como la β -galactosidasa, necesarias para descomponer otros sustratos. En 1965 hubo un sorprendente descubrimiento. El AMP cíclico, el cual previamente se pensó que sólo participaba en el metabolismo de los eucariotes, se descubrió en células de *E.coli*. Se observó que la concentración de AMPc en las células se relaciona con la presencia de glucosa en el medio: cuanto mayor la concentración de glucosa, menor la concentración de AMPc. Además, cuando se añade AMPc al medio en presencia de glucosa, todas las enzimas catabólicas normalmente ausentes de pronto fueron sintetizadas por las células⁵⁸.

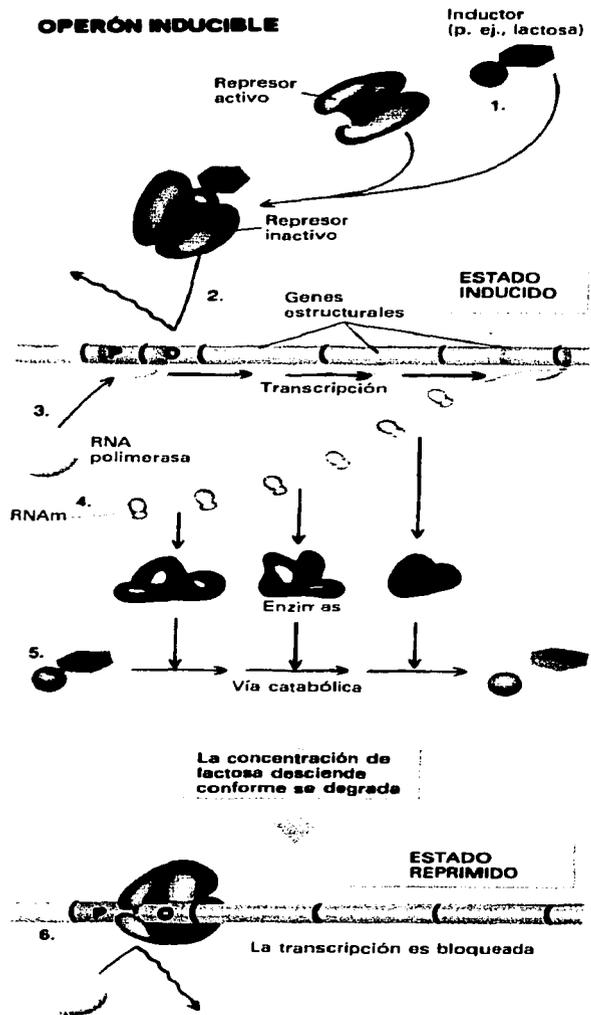


Fig. 109. Mecanismo del Operón Inducible, representado por el operón *lac*.

1) En Concentración elevada, el inductor (en este caso el disacárido lactosa) se enlaza a la proteína represora y, 2) impide que se fije al operador (O). 3) sin el represor en su camino, la RNA polimerasa se fija al promotor (P) y 4) transcribe los genes estructurales y se elaboran las enzimas necesarias para digerir el azúcar. 5) Conforme se metaboliza el azúcar su concentración disminuye, 6) provocando que el inductor enlazado a moléculas se disocie del represor, el cual recupera su capacidad para fijarse al operador y evitar la transcripción y consecuente síntesis de enzimas innecesarias⁵⁸.

TESIS CON
FALLA DE URGEN

2.9.2. Operón Represible: El Operón Trp.

En otros casos, es necesario que la expresión de ciertos genes se detenga tan pronto como sea metabólicamente posible, porque su actividad no sea necesaria, para lograr una mayor economía de la energía celular. Es el caso por ejemplo, de los operones de la arginina y el triptófano, éste último se explicará con más detalle y se ilustra en la Fig. 110.

Si la cantidad de trp presente en las proteínas que se encuentran en el medio en que crece una bacteria es suficientemente alta como para satisfacer las necesidades bacterianas de este aminoácido, no es necesario que la bacteria lo sintetice sino que, simplemente, lo asimila de la dieta. Ahora bien, si la cantidad de trp exógeno no fuera suficiente, las bacterias pueden sintetizarlo a partir de otros precursores mediante el concurso de una serie de enzimas codificadas con el operón de triptófano. Así pues, el operador de este operón se une a una proteína represora específica. Sin embargo, en este caso la proteína represora se mantiene unida siempre que a ella se encuentre unida, a su vez, una molécula de triptófano o un análogo de este. Cuando la concentración celular de trp desciende por debajo de unos niveles críticos (que vienen determinados por la constante de afinidad de la molécula represora por el trp o su análogo) el represor se separa del trp y queda inactivo, separándose también de la secuencia operadora y permitiendo la transcripción de los genes que codifican las proteínas de síntesis endógena de trp. El efecto final es la expresión de los genes del operón como respuesta a los niveles de trp presentes en la célula ⁸³.

2.9.3. Control de la Expresión génica en Bacteriófagos.

El fago λ es quizás el bacteriófago mejor estudiado, se conoce bien la regulación de su expresión génica y está dada por la "decisión" entre la respuesta lítica o lisogénica determinada por la competencia entre dos represores, *cl* y *cro*.

El fago λ es un fago temperado, puede presentarse en estado vegetativo o como profago integrado en el cromosoma huésped. Tiene dos ciclos biológicos alternativos: el ciclo lisogénico y el ciclo lítico; la expresión de uno de ellos depende del acceso de dos represores denominados *cl* y *cro*, a los operadores. El represor *cl* favorece la lisogenia y reprime el ciclo lítico. El represor *cro* favorece el ciclo lítico y reprime la lisogenia. Los operadores, cuando tienen unidos *cl* o *cro*, pueden intensificar o reprimir la transcripción. Hay otros mecanismos de regulación que también intervienen en la determinación de ciertos aspectos del ciclo del fago λ , como son la antiterminación y los promotores múltiples del mismo gen ⁸⁴.

2.9.3.1 Operones del fago λ .

Los genes del fago λ están agrupados en cuatro operones: izquierdo, derecho, tardío y represor, (véase Fig. 111). Los operones derecho e izquierdo contienen los genes de la replicación del DNA, la recombinación y la integración del fago. El operón tardío contiene los genes que determinan las proteínas de la cabeza y de la cola del fago y la lisis de la célula huésped. El mapa de λ es un círculo, pero el cromosoma tiene dos etapas lineales en su ciclo biológico. Está empaquetado dentro de la cabeza del fago en una de las formas lineales y se integra en el cromosoma huésped para formar un profago en otra forma lineal. Estas dos formas lineales no tienen los mismos extremos. El DNA maduro, que está empaquetado en la cabeza del fago antes de la lisis de las células está flanqueado por sitios *cos* y proviene de una rotura en el mapa circular entre los loci *A* y *R*. El profago está integrado en el sitio *att* y por esto el mapa circular se rompe por aquí en la integración ⁸⁴.

OPERÓN REPRESIBLE

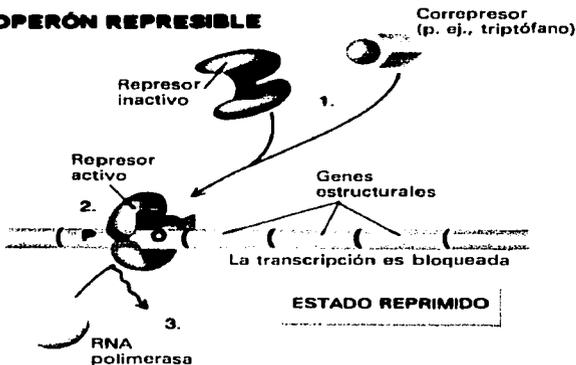
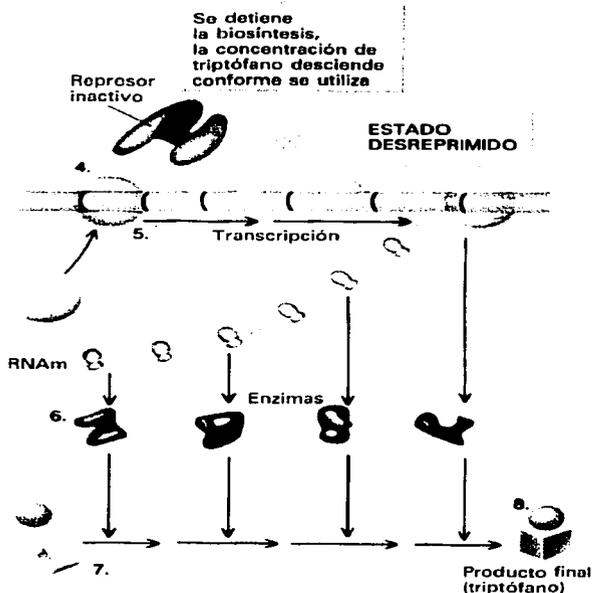


Fig. 110.- En un operón represible, como el operón *trp*, el represor, por sí mismo, es incapaz de enlazarse al operador, y los genes estructurales que codifican las enzimas son transcritos activamente. 1) Cuando se encuentran disponibles, las moléculas de triptófano actúan como correpresores uniéndose al represor inactivo y 2) cambian su forma de modo que puedan fijarse al operador, 3) evitando la transcripción de los genes estructurales. Por lo tanto, cuando la concentración de *trp* es alta, el operón está reprimido, evitando la producción excesiva del *trp*. 4) Cuando la concentración de *trp* es baja, la mayor parte de las moléculas represoras carecen de un correpressor y por lo tanto no se fijan al operador. 5) Se transcriben los genes, 6) se sintetizan las enzimas, y 7) se elabora el producto final necesario (triptófano). 8) Conforma la biosíntesis prosigue, el triptófano se acumula en una concentración lo suficientemente alta para reprimir de nuevo al operón ⁵⁸.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

los ciclos lítico y lisogénico. Ahora se produce *integrasa* (el producto del gen *int*) y *cI* (represor), favoreciendo la lisogenia, así como también el producto del gen *cro*, el antirepresor, que es un represor de *cI* y por lo tanto favorece la vía de la lisis²⁴.

2.9.4. Otros Mecanismos de Control.

Existen otros elementos de control de la expresión génica como los transposones. Son elementos genéticos móviles, cuyas copias se insertan en otros lugares del genoma. Sus extremos son repeticiones invertidas. Después de su inserción, están flanqueados por repeticiones cortas directas. Pueden ser simples (elementos IS) o complejos. Su presencia puede causar inversiones o deleciones. Por ejemplo, la fase flagelar de *Salmonella* está regulada por la orientación de un transposón.

Otra forma de regulación transcripcional son los distintos promotores de operones tempranos y tardíos en fagos, como se observa en la transcripción del fago T4 y en la transcripción de proteínas de choque térmico. La regulación traduccional se ejerce a través de la posición de los genes en el operón (los genes del principio de transcriben con más frecuencia), a través de la degeneración de código genético o a través de una respuesta restrictiva que interrumpe la mayor parte de la transcripción durante la escasez. La regulación postraduccional se da principalmente mediante inhibición por retroalimentación. La tasa de degradación proteica está programada por el aminoácido N-terminal o por determinadas regiones de las proteínas²⁴.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2.10 Mecanismos de Regulación Génica en Eucariotes.

Las proteínas sintetizadas por una célula bacteriana son determinadas extensamente por las condiciones en las cuales está creciendo la célula. Los problemas que confrontan las células eucariotas son más complejos. Además de poseer un genoma que contiene mucha mayor información, las células de una planta o un animal complejo existen en gran variedad de estados diferenciados. La regulación de la expresión de un gen en este tipo de células ocurre principalmente a tres niveles distintos, como se muestra en la Fig. 112:

- Los mecanismos de **control a nivel de transcripción** determinan si un gen particular será transcrito y en caso afirmativo, con qué frecuencia.
- Los mecanismos de **control a nivel de procesamiento** determinan la vía para procesar un transcrito de RNA primario en un RNA mensajero que puede traducirse en un polipéptido.
- Los mecanismos de **control a nivel de traducción** determinan si un RNAm particular será realmente traducido, y si esto es así, con qué frecuencia y durante cuánto tiempo ¹⁰⁰.

Siendo la clonación el tema de controversia actual, es interesante señalar que un estudio llevado a cabo por investigadores del Instituto Whitehead indica que los animales clonados presentan anomalías en la expresión genética, que se deben a irregularidades en el gen de impresión que se emplea para llevar a cabo la clonación ¹⁰¹. De ahí la importancia del estudio de estos mecanismos de control.

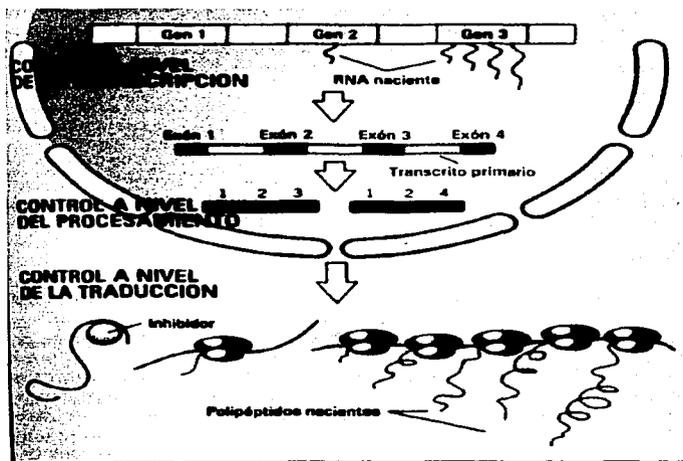


Fig. 112. La expresión del gen es controlada en tres niveles primarios: Transcripción, Procesamiento o Traducción ⁵⁶.

2.10.1 Mecanismos de Control a Nivel de Transcripción.

En diferentes etapas del desarrollo, células de diferentes tejidos sometidas a diversos estímulos expresan diferentes genes. La transcripción de un gen particular está controlada por factores de transcripción que son proteínas capaces de enlazarse a secuencias específicas localizadas en sitios fuera de la región codificante del gen. La secuencia reguladora más próxima hacia delante es el cuadro TATA, que es el principal componente del promotor del gen y sitio de ensamblado del complejo precursor de inicio. Se cree que la actividad de las proteínas en el cuadro TATA depende de interacciones con otras proteínas enlazadas a otros sitios, incluyendo diferentes tipos de elementos de respuesta y elementos amplificadores. Ver Fig. 113. Los elementos amplificadores se distinguen por el hecho de que de que pueden desplazarse de un sitio a otro dentro del DNA, incluso siguiendo dirección inversa. Algunos amplificadores se localizan a veces a 10,000 pares de bases por delante del gen cuya transcripción estimulan. Se cree que las proteínas enlazadas a un amplificador y a un promotor entran en contacto gracias a la acción de las asas formadas en el DNA ⁵⁸.

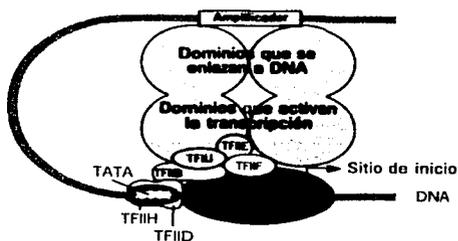


Fig. 113.- Representación esquemática de un factor de transcripción (representado como dímero) con dominios separados que interactúan con una secuencia DNA específica (un amplificador) y con el mecanismo basal de transcripción que reside en el cuadro TATA del promotor. Se cree que esta última interacción estimula la transcripción (o la inhibe si el factor es un represor), alterando la conducta del mecanismo de transcripción ⁵⁸.

La determinación de la estructura tridimensional de algunos complejos formados entre factores de transcripción y DNA indica que estas proteínas se enlazan al DNA mediante un número limitado de motivos estructurales. En condiciones típicas, los factores de transcripción contienen cuando menos dos dominios, uno cuya función es reconocer y enlazarse a una secuencia específica de pares de bases en el DNA, y otro cuya función es activar la transcripción al interactuar con otras proteínas. La mayor parte de los factores de transcripción se enlazan al DNA en forma de dímeros, sean heterodímeros u homodímeros, que reconocen secuencias en el DNA que poseen simetría doble. Casi todos los motivos que se enlazan al DNA contienen un segmento, a menudo una hélice α , dentro del surco mayor del DNA, donde reconocen la secuencia de pares de bases que reviste dicho surco. Entre los motivos más comunes presentes en las proteínas que se enlazan al DNA se encuentra el dedo de zinc, la hélice-asa-hélice, y el cuadro GME. (Fig. 114, 115, 116). Cada uno de estos motivos proporciona un armazón estructuralmente estable sobre el cual la superficie de la proteína que reconoce específicamente el DNA puede interactuar con la doble hélice de DNA.

Aunque tal vez la mayor parte de los factores de transcripción sean estimuladores, algunos actúan inhibiendo la transcripción ⁵⁸.

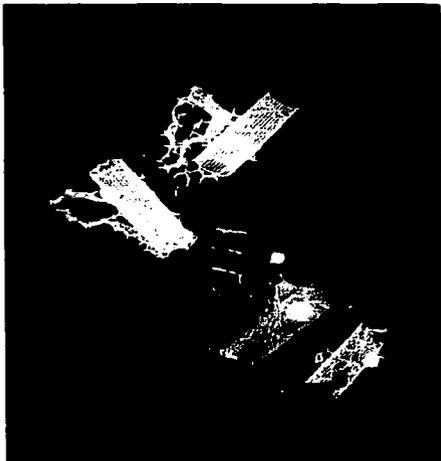


Fig. 114.- Factores de transcripción que se enlazan por medio del motivo dedo de zinc. La figura muestra un modelo del complejo formado entre una proteína con cinco dedos de zinc (llamada GLI) y DNA. Cada uno de los dedos de zinc tiene color diferente, el DNA es de color azul oscuro. Cilindros y cintas resaltan las hélices α y las láminas β , respectivamente ⁵⁸.



Fig. 115.- Factor de transcripción con un motivo Hélice-Asa-Hélice (HAH) El sitio de enlace de DNA de 14 pares de bases se muestra en azul, la región básica es roja al igual que las cadenas laterales que constituyen contactos específicos para bases y fosfatos de DNA. La región HAH se muestra en amarillo ⁵⁸.

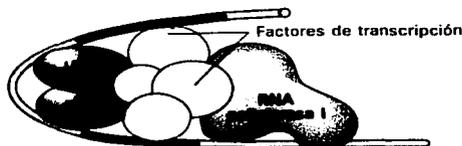


Fig. 116.- EL Cuadro GME se denomina así porque fue el primero que se descubrió en un abundante grupo de proteínas denominado Grupo de Movilidad Elevada (GME). Los factores de transcripción que poseen cuadros GME activan la transcripción porque deforman el DNA confiriéndole una conformación que incrementa la transcripción. La Fig. ilustra la proteína GME mejor estudiada: UBF, que activa la transcripción de genes RNAr por la RNA polimerasa I. UBF se enlaza al DNA en forma de dímero cuyas dos subunidades contienen un total de 10 cuadros GME. Mediante su interacción con sitios sucesivos a lo largo del DNA, los cuadros GME deforman la hélice de DNA de tal modo que producen un asa alrededor de la proteína, como se muestra en esta figura. La formación del asa ocasiona la proximidad de dos secuencias reguladoras que pueden enlazarse para colaborar con un solo factor de transcripción ⁵⁸.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Se piensa que la metilación de las bases citosina de ciertos nucleótidos residentes en regiones ricas en G-C inactivan funcionalmente a los genes eucariotas. La metilación es una modificación dinámica; existen enzimas para eliminar grupos metilo y también para añadirlos. La adición de grupos metilo en regiones reguladoras clave por delante de los genes se correlaciona con disminución de la transcripción del gen, en tanto que la eliminación de dichos grupos metilo se correlaciona con incremento de la transcripción. El efecto de la metilación es particularmente evidente en la cromatina que ha sido inactivada a nivel de transcripción mediante heterocromatización, como el cromosoma X inactivo de la célula de los mamíferos hembra. Otro fenómeno relacionado con la metilación del DNA es la impresión genómica, que afecta a un pequeño número de genes del embrión activos o inactivos a nivel de transcripción según el progenitor del cual se originen.

La incorporación del DNA a los nucleosomas añade otra dimensión al control de la transcripción. El acomodo preciso del nucleosoma en la región reguladora de un gen desempeña un papel importante al permitir que las proteínas que se unen a DNA estimulen la transcripción de dicho gen como se muestra en la Fig. 117. La interacción de un factor de transcripción con el DNA puede inducir cambios secundarios en la estructura de la cromatina permitiendo que otros sitios sean más o menos accesibles al enlace subsecuente de proteínas. Además, la cromatina activa a nivel de transcripción posee ciertas propiedades distintivas que la distinguen de la cromatina inactiva, sobre todo de sitios hipersensibles a la digestión enzimática del DNA. Ciertas pruebas indican que los nucleosomas sufren modificaciones que hacen más accesible el DNA a las moléculas de polimerasa conforme se transcribe el DNA empaquetado ⁵⁴.

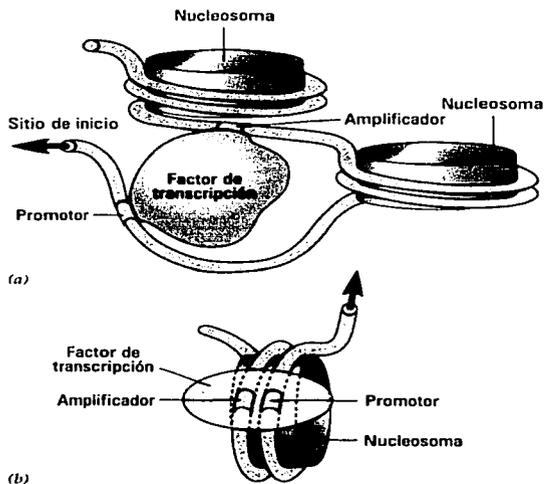


Fig. 117.- Papel del posicionamiento del nucleosoma para facilitar la transcripción.

a) El nucleosoma se coloca en una posición de modo que los elementos reguladores claves del gen permanecen fuera de la partícula central y disponibles para enlazarse a los factores de transcripción. b) En este caso, los elementos reguladores se localizan en el DNA que rodea las histonas centrales. Gracias a estas histonas, los elementos reguladores clave del DNA entran en estrecho contacto y pueden unirse a un factor de transcripción ⁵⁴.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2.10.2 Mecanismos de Control a Nivel de Procesamiento del Transcrito Primario.

La expresión de genes es regulada a nivel de procesamiento por el empalme alternativo, proceso mediante el cual un solo gen puede codificar dos o más proteínas relacionadas. Se pueden procesar muchos transcritos primarios a través de más de una vía, produciendo RNAm que contiene diferentes combinaciones de exones, véase Fig. 118. En el caso más simple, un intrón específico puede ser empalmado fuera del transcrito o retenido como parte del RNAm final. Se piensa que la vía específica seguida durante el procesamiento de precursores de RNAm depende de la presencia de proteínas que controlan los sitios de empalme reconocidos por desdoblamiento⁵⁸.

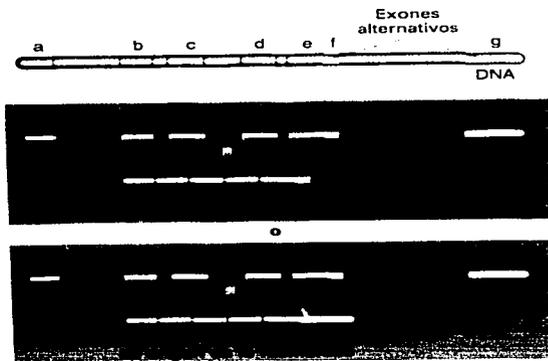
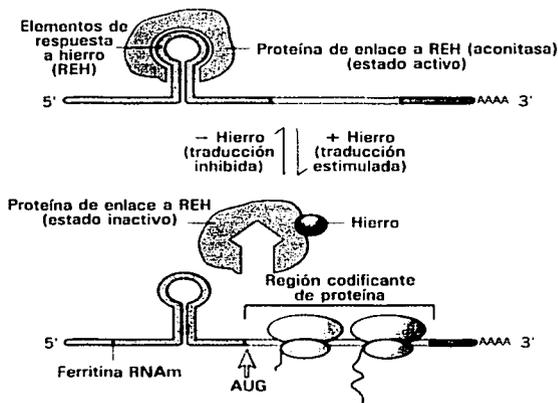


Fig. 118.- Empalme alternativo de genes que codifican anticuerpos. Anticuerpos con el mismo sitio para combinarse con antígenos pueden presentarse en dos formas: como proteínas solubles de origen sanguíneo o como proteínas enlazadas a la membrana plasmática de un linfocito B. La secuencia de aminoácidos de las dos formas del anticuerpo difiere en un extremo de la molécula. Estas diferencias ocurren debido a que las dos formas de polipéptidos se sintetizan en diferentes RNAm derivados del mismo transcrito primario por procesamiento alternativo. El exón marcado como "f" se incorpora al RNAm que codifica la versión del origen sanguíneo del anticuerpo, en tanto que un exón alterno (g) se incorpora al RNAm para la versión enlazada a la membrana⁵⁸.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2.10.3 Mecanismos de Control a Nivel de Traducción.

La expresión de genes es regulada a nivel de traducción por diferentes procesos, incluyendo localización del RNAm, control de la traducción de los RNAm existentes y longevidad del RNAm. Casi todas estas actividades reguladoras son mediadas por interacciones con las regiones no traducidas 5' y 3' (RNT) del RNAm. Por ejemplo, se piensa que la localización del RNAm en regiones particulares de los huevos de la mosca es mediada por proteínas que reconocen secuencias de localización en la RNT3'. La presencia de un RNAm en el citoplasma no garantiza su traducción. El mecanismo sintetizador de proteínas de una célula puede estar controlado globalmente de modo que se pueda afectar la traducción de todos los RNAm, o la traducción de RNAm específicos, como ocurre en el control de la síntesis de ferritina por la concentración de hierro que actúa por medio de proteínas que se enlazan a la RNT5' de la ferritina de RNAm (Fig. 119). Uno de los factores primarios que controlan la longevidad (estabilidad) del RNAm normalmente se encuentra protegida por una proteína unida a poli(A). Nucleasas específicas dentro de la célula gradualmente acortan el apéndice poli (A) hasta alcanzar un punto donde la proteína protectora ya no puede ser retenida por el apéndice. Una vez perdida la proteína, el RNAm queda sin su casquete y su descomposición ocurre en la dirección 5' a 3' ⁵⁸. Véase Fig. 120.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Fig. 119.- Control de la traducción de la ferritina. Cuando la concentración de hierro es baja, una proteína enlazada a hierro, denominada aconitasa, se enlaza a una secuencia específica en la región no traducida 5' de la ferritina RNAm conocida como elemento de respuesta al hierro (ERH), que se encuentra plegado en forma de horquilla. Cuando se dispone de hierro, se enlaza al represor, cambiando su conformación y provocando la disociación del ERH, lo que permite la traducción del RNAm para formar ferritina ⁵⁸.

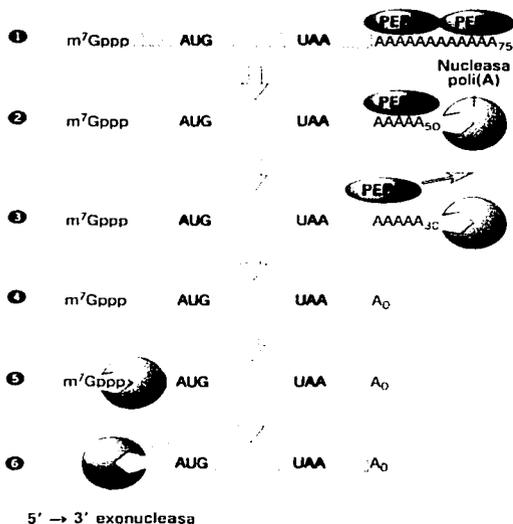


Fig. 120.- Degradación del RNAm.

2. Cuando un RNAm permanece en el citoplasma, su apéndice poli (A) tiende a disminuir gradualmente de longitud a medida que es reducido por la nucleasa poli(A). 3.- No se observa efecto alguno sobre la estabilidad del RNAm hasta que el apéndice se reduce unos 30 residuos, que quizás sea una longitud demasiado pequeña para retener una molécula PEPA (Proteína de enlace a poli (A)) enlazada. 4.- Una vez que la longitud del apéndice se acorta, el RNAm parece desdoblarse con rapidez. Es interesante que la descomposición del RNAm comience en el extremo 5' luego de eliminar el poli(A) en el extremo 3' del mensaje. De alguna manera, la presencia del apéndice poli(A) en el extremo 3' del mensaje parece mantener el casquete en el extremo opuesto de la molécula. 5.- El mensaje pierde su casquete. 6.- se descompone a partir del extremo 5' sin casquete hacia el extremo 3' ⁵⁸.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CAPITULO 3 DNA RECOMBINANTE

Aunque los seres humanos han alterado la dotación genética de los organismos durante siglos mediante la reproducción selectiva, sólo recientemente ha sido posible la manipulación directa del DNA. La modificación deliberada de la información genética de un organismo cambiando directamente su genoma se denomina **Ingeniería Genética**, y se logra mediante un conjunto de métodos conocidos como **Tecnología del DNA recombinante** ¹⁰².

En los inicios de la década de los 70's, bioquímicos de la Universidad de Stanford demostraron que las características genéticas podían en realidad ser transferidas de un organismo a otro. En este experimento, el DNA de un microorganismo se recombinó con la secuencia de DNA insertada de otro; de esta manera el nuevo microorganismo se había "editado" para tener una modificación muy específica. El actual proceso de "edición" o inserción es asombroso, ya que involucra la increíble manipulación de pequeñísimas piezas de pequeñísimos organismos. Pero el proceso puede ser explicado en términos de la edición de un texto: "tijeras" y "pegamento" son usados para "cortar" y "pegar" ¹⁰³.

Algunos usos del DNA recombinante son los siguientes:

1. **Obtener grandes cantidades de fragmentos DNA específicos**
 - a. Estudiar la estructura del gen
 - b. Estudiar la regulación del gen
 - c. Determinar la secuencia ácido-nucleico/aminoácido
 - d. Modificar la secuencia del ácido nucleico / generar proteínas mutantes
2. **Producción de grandes cantidades de proteínas puras (por ejemplo hormonas, interferon, drogas de grado farmacéutico, etc.)**
3. **Modificación del genotipo / fenotipo de una célula huésped (por ejemplo animales transgénicos, técnicas de terapia génica, etc.)** ¹⁰⁴

Las técnicas del DNA recombinante permiten incluso estudiar aquellas proteínas celulares mas pequeñas. Esta es la principal ventaja sobre los métodos convencionales como la cromatografía y electrofóresis, los cuales, darían ínfimas cantidades de una proteína pura. Debido a que muchas sustancias de gran valor comercial están presentes en pequeñas cantidades en las células la importancia de las técnicas utilizadas para producir DNA recombinante es de gran interés y se describe a continuación una secuencia del proceso ¹⁰⁵.

- a) La célula se fracciona por métodos cromatográficos convencionales para producir un microgramo de proteína, el cuál puede obtenerse en forma pura por electrofóresis.
- b) La proteína es analizada para obtener la identidad de los primeros 30 aminoácidos.
- c) El código genético es utilizado para predecir la secuencia de nucleótidos que corresponda a la secuencia de aminoácidos, y se lleva a cabo una síntesis rápida de este fragmento de DNA.
- d) Estos fragmentos cortos de DNA son utilizados para identificar el RNAm complementario a partir del cual se produce DNA clonado (DNAc) utilizando la enzima transcriptasa reversa.
- e) La clonación produce grandes cantidades de DNAc.

- f) El DNA producido a partir de cada clon es hibridizado para producir RNAm. Posteriormente se produce RNAm puro que corresponda a cada secuencia de DNAc.
- g) Habiendo analizado, por procedimiento de síntesis de proteínas libre de célula, cuál RNAm codifica para la proteína deseada, el DNAc apropiado es secuenciado y utilizado para determinar la secuencia de aminoácidos de la proteína.
- h) Finalmente, el DNA clonado es incorporado en un vector plásmido y transferido a células bacterianas o levaduras. Este es el punto de inicio de la producción a escala de grandes cantidades de la proteína purificada.

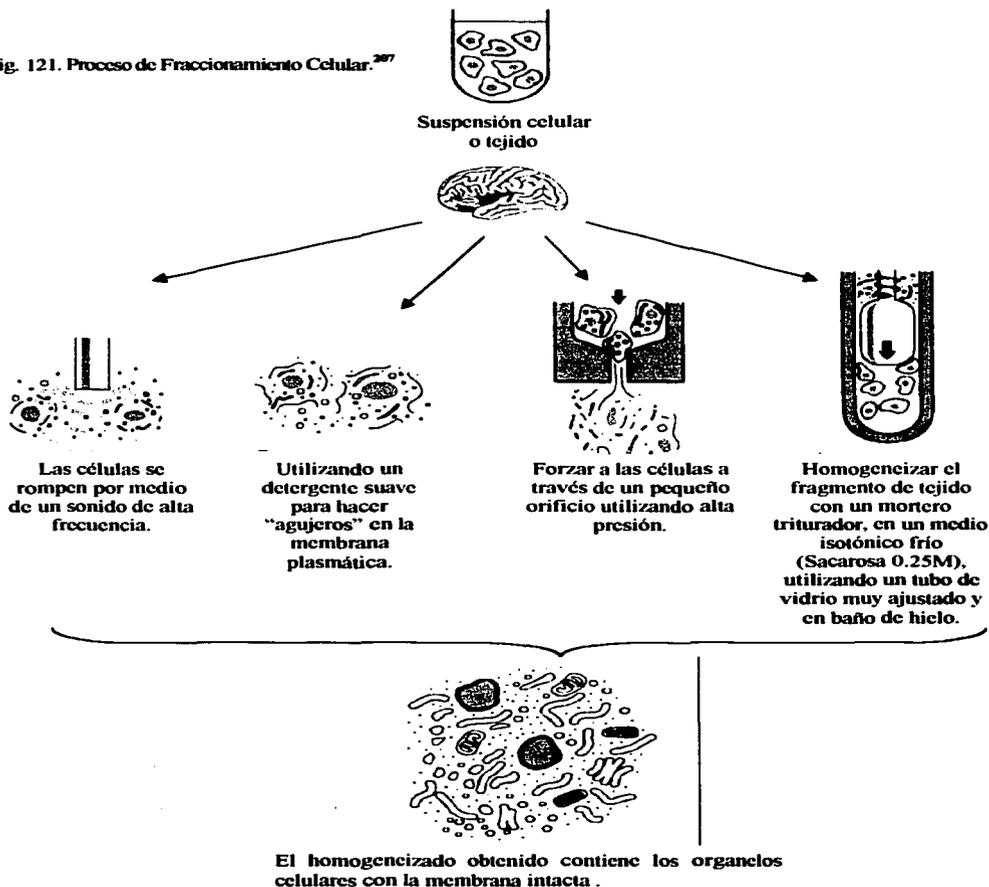
El proceso anterior está descrito de manera general, la variedad de técnicas de Biología Molecular utilizadas aumenta conforme se van desarrollando nuevos avances, pero los métodos básicos en los que se basa la tecnología del DNA recombinante son:

- ⊙ **Reconocimiento de Endonucleasas de Restricción**
Las enzimas de restricción reconocen secuencias específicas en la doble cadena del DNA y se introducen en estas secuencias o cerca de ellas. Las endonucleasas de restricción simplifican las estrategias de clonación de genes y facilitan el mapeo físico del DNA ¹⁰⁴.
- ⊙ **Clonación del DNA**
Con el uso de enzimas de restricción, las moléculas de DNA recombinante pueden ser construidas y genes individuales o fragmentos de DNA pueden ser producidos en masa para aislamiento de grandes cantidades.
- ⊙ **Enzimas de Modificación.**
Se han explotado muchos tipos de enzimas modificantes de ácido nucleico para la clonación de DNA y la preparación de sondas.
- ⊙ **Hibridación Molecular**
Una variedad de técnicas utiliza sondas DNA o RNA para detectar secuencias homólogas de ácidos nucleicos.
- ⊙ **Secuenciación de DNA.**
El reconocimiento químico o la terminación de cadena sobre cada base para formar una escalera de fragmentos de DNA se logra por la pérdida sucesiva de la base terminal y la resolución en electroforesis en gel de poliacrilamida; la secuenciación proporciona tanto la información estructural y funcional de un gen como la codificación de transcripción y la proteína.
- ⊙ **Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)**
La amplificación específica de secuencias de DNA ó RNA con poca capacidad de copiado puede ser lograda por PCR y otros sistemas enzimáticos ¹⁰⁴.

3.1 FRACCIONAMIENTO CELULAR

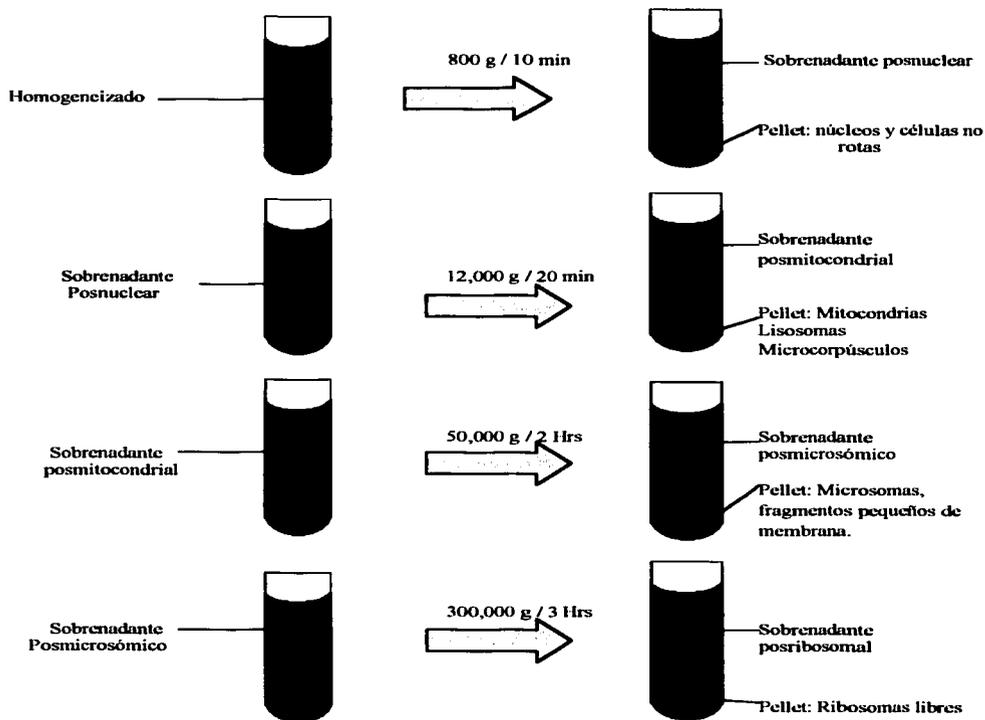
Para poder estudiar el DNA o determinar la secuencia de alguna proteína de interés es necesario obtenerlos a partir de extractos crudos de tejido¹⁰³. A continuación se describe un protocolo básico de fraccionamiento celular mediante centrifugación diferencial (Fig. 121 y Fig. 122.)

Fig. 121. Proceso de Fraccionamiento Celular.²⁰⁷

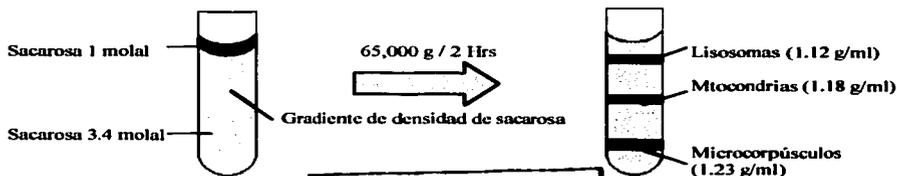


TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Fig. 122. Los componentes celulares y subcelulares se aíslan del homogeneizado mediante centrifugación diferencial.⁶⁸



Material resuspendido de Pellets de 12g



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

3.2 AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE DNA

Una vez obtenido el DNA de interés se procede a purificarlo. El principal objetivo de los protocolos de purificación es separar al DNA de materiales contaminantes, como RNA, oligosacáridos y proteínas. La desproteínización en general se logra agitando la mezcla con un volumen de fenol. El fenol (o alternativamente cloroformo) es un desnaturizador activo de proteínas que suprime la solubilidad de éstas en la preparación y las precipita. Puesto que el fenol y las soluciones salinas amortiguadoras no se mezclan, sólo se requiere centrifugar la suspensión para separar las fases, permaneciendo el DNA (y el RNA) en la solución dentro de la fase acuosa de arriba y la proteína presente como un precipitado floculento concentrado en la interfase. La fase acuosa se retira del tubo y se somete a ciclos repetidos de agitación con fenol y centrifugación hasta agotar la proteína. A continuación los ácidos nucleicos se precipitan con etanol frío, el RNA queda como precipitado floculento en el fondo del tubo. Se elimina con una ribonucleasa y ésta a su vez se destruye tratando la solución con una proteasa. Si lo que se desea es purificar el RNA, se utilizará una DNAsa en lugar de la ribonucleasa.⁵⁹

3.2.1 Protocolos para Extracción y Purificación de DNA

3.2.1.1 Extracción Orgánica.

1. Añadir un volumen de fenol saturado-TE (fenol neutralizado con buffer TE a pH 7.5) igual al de la muestra de DNA contenida en un tubo para microcentrífuga, colocar en un vortex durante 15-30 segundos.
2. Centrifugar durante 5 min a temperatura ambiente para separar las fases.
3. Remover aproximadamente el 90% de la capa superior acuosa a un tubo limpio, evitar las proteínas en la interfase fenol: agua. En esta etapa la fase acuosa puede ser extraída una segunda vez con un volumen igual de Fenol-TE:cloroformo, centrifugar y pasar a un tubo limpio, pero esta segunda extracción no es necesaria si se realiza con cuidado la primera.
4. Añadir un volumen igual de éter saturado – agua, colocar en el vortex por unos segundos y centrifugar por 3 minutos a temperatura ambiente. Remover y descartar la fase superior, teniendo cuidado de remover las gotas de fenol en la interfase agua:éter. Repetir la extracción.
5. El etanol precipita al DNA al añadir 2.5 – 3 volúmenes de una mezcla etanol-acetato¹⁰⁰.

3.2.1.2 Precipitación con etanol – Concentración de ácidos nucleicos.

1. Estimar el volumen de la solución de ácidos nucleicos. La eficiencia de recuperación del etanol es proporcional a las concentraciones de ácido nucleico; por lo tanto se recomiendan volúmenes mínimos para precipitación.

2. Añadir una sal a la concentración final de al menos:

Cloruro de Sodio	0.10 M
Acetato de Sodio	0.25 M
Cloruro de Litio	0.80 M
Acetato de Amonio	2.00 M

- a) El acetato de amonio es utilizado para reducir la co-precipitación de dNTPs ú oligonucleótidos.
 - b) El cloruro de litio es útil para precipitar RNA, el cual puede requerir mayores concentraciones de etanol (LiCl es más soluble en etanol).
 - c) El cloruro de sodio puede ser utilizado para mantener el SDS soluble en etanol; sin embargo, el NaCl tiene la solubilidad más baja de todas estas sales en soluciones de etanol.
 - d) El acetato de sodio es utilizado para la mayoría de las precipitaciones de rutina.
 - e) La adición de 10 mM de cloruro de magnesio ayudará en la precipitación de oligonuceótidos y DNAs mayores a 100 pares de bases (los nucleótidos libres también pueden ser precipitados ¹⁰⁴.
3. Añadir 2 volúmenes de etanol al 95% (ó 0.6 volúmenes de isopropanol y mezclar bien (añadir de 2.5 a 3 volúmenes de etanol para precipitación de RNA)
4. Centrifugar aproximadamente 15 – 30 minutos en una microcentrifuga (12,000 x g) a 4° C ó de 10 a 15 minutos a temperatura ambiente. Los precipitados enfriados en hielo seco ocasionan problemas de viscosidad los cuales pueden conducir a una recuperación ineficiente de ácidos nucleicos. El parámetro más importante para una buena recuperación de ácido nucleico es el tiempo de centrifugación.
5. Remover el sobrenadante, enjuagar con etanol al 70% para remover el exceso de sales y, secar el pellet al vacío o al aire ¹⁰⁴.

3.2.1.3 El Método Glass Max

El Spin Cartridge System para aislamiento de DNA está basado en el principio descrito por primera vez por Gillespie y Volgenstein (Fig. 123). Para utilizar este sistema, se añade una solución acopladora que contiene yoduro de sodio a la muestra de DNA y se aplica al dispositivo. Durante el proceso de centrifugación de 20 segundos, el DNA se enlaza a la membrana con base de sílica en la base del dispositivo. Las impurezas y el yoduro de sodio residual se remueven por lavado y centrifugado del dispositivo con un buffer de lavado. Posteriormente el DNA purificado es eluido en buffer TE ó agua ¹⁰⁴. Este método es muy utilizado actualmente para cualquier tipo de purificación de DNA y existe otro dispositivo para RNA ¹⁰⁵. Las cantidades de DNA que pueden recuperarse se observan en la tabla 4.

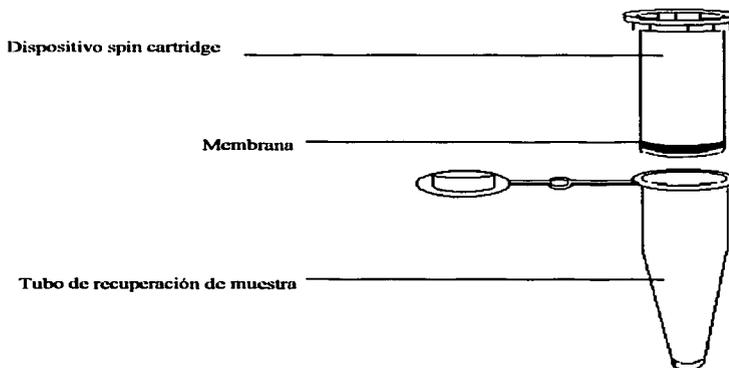


Fig. 123. Estructura del dispositivo spin cartridge para aislamiento de DNA. ¹⁰⁴

Tabla 4. Recuperación de DNA marcado con ³²P con el dispositivo para aislamiento de DNA GlassMax[®]. ¹⁰⁴

Tamaño DNA (lb)	Cantidad de DNA empacado (µg)						
	>1 ^b	1	2	5	10	25	50
50	82	81	77	67	63	42	32
5	59	58	60	51	33		
0.3-	80	67	62	38			
0.8							

^a Los datos son representados como porcentaje de radioactividad de entrada (inicial).

^b 25 - 50 ng.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

3.2.2 Análisis Espectrofotométrico de Ácidos Nucleicos.

3.2.2.1 Recolección de datos.

- a) Un pico de absorbancia de 260 nm para anillos de purina y pirimidina está presente en el DNA.
- b) 280 nm.- para detección de proteínas, basado en la presencia de aminoácidos aromáticos que exhiben picos de absorbancia a esta longitud de onda (mientras esta longitud de onda sea menos sensible que 230 nm, se utiliza comúnmente debido a la falta de interferencia.)
- c) 230 nm.- Para detección de proteínas, basada en la absorbancia por enlaces péptidos (mientras que esta es una longitud de onda sensible para detección de proteínas, los buffers comúnmente utilizados como el Tris interfieren con esta medición.
- d) 270 nm ó 302 nm.- Para detección de fenol en la muestra.
- e) 320 nm.- Para corrección por base (absorbancia debida a dispersión, etc) Realizando la substracción de la absorbancia a esta longitud de onda de la absorbancia a cualquier otra longitud de onda ayuda a corregir la contribución de base ¹⁰⁴.

3.2.2.2 Factores de Conversión de Concentración.

- DNAds – Unidad l $A_{260} = 50 \mu\text{g/ml}$
- DNAss – Unidad l $A_{260} = 33 \mu\text{g/ml}$
- RNAss – Unidad l $A_{260} = 40 \mu\text{g/ml}$
- Oligonucleótidos – Unidad l $A_{260} = 20 \mu\text{g/ml}$

3.2.2.3 Estimación de pureza.

El cálculo del índice de absorbancia A_{260}/A_{280} es un método comúnmente utilizado para la determinación de pureza de ácidos nucleicos (falta de proteínas y contaminación de solventes orgánicos). Un valor > 1.8 es considerado como de alta pureza en una solución de ácido nucleico ¹⁰⁴.

3.2.2.4 Tinción de Bromuro de Etidio.

Detecta 1 ng de DNA (sobre geles el límite más bajo de detección es de aproximadamente 5 ng) ¹⁰⁴.

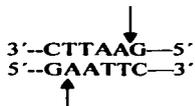
- Excitación del bromuro de etidio a 260 – 360 nm.
- Emisión de bromuro de etidio a 560 nm (rojo – naranja).
- El bromuro de etidio retarda la migración del DNA en geles.

3.3 USO DE ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

3.3.1 Definición

Las moléculas lineales largas de DNA son estructuras frágiles, que se escinden fácilmente en fragmentos si se hace pasar varias veces la suspensión de DNA a través de la aguja de una jeringa. También puede cortarse el DNA mediante enzimas de restricción ¹⁰².

Las enzimas de restricción, llamadas también endonucleasas de restricción, deben la denominación a que las bacterias las emplean para destruir el DNA viral capaz de penetrar a la célula, y por lo tanto restringen el potencial de crecimiento de los virus. El propio DNA de la bacteria se encuentra protegido de ataques nucleolíticos por mutilación de los sitios susceptibles sobre las bases, modificación química que impide la acción de la enzima ⁵⁸. Estas enzimas rodean la molécula del DNA en el punto deseado (una secuencia específica). Se han aislado enzimas de varios cientos de organismos procariontes diferentes que, en conjunto, reconocen más de 100 distintas secuencias de nucleótidos. Las secuencias reconocidas por estas enzimas son de cuatro a ocho nucleótidos de largo y se caracterizan por un tipo particular de simetría interna. Veamos por ejemplo la secuencia particular reconocida por la enzima *EcoRI*:



Se dice que este segmento posee simetría rotacional doble porque puede girar 180° sin cambiar la secuencia de bases. Por lo tanto, si uno lee la secuencia en la misma dirección (3' a 5' o 5' a 3') sobre cada cadena, se observa el mismo orden de bases. Una secuencia con este tipo de simetría se denomina **palíndromo** ⁵⁸. La acción de esta enzima se esquematiza en la Fig. 124.

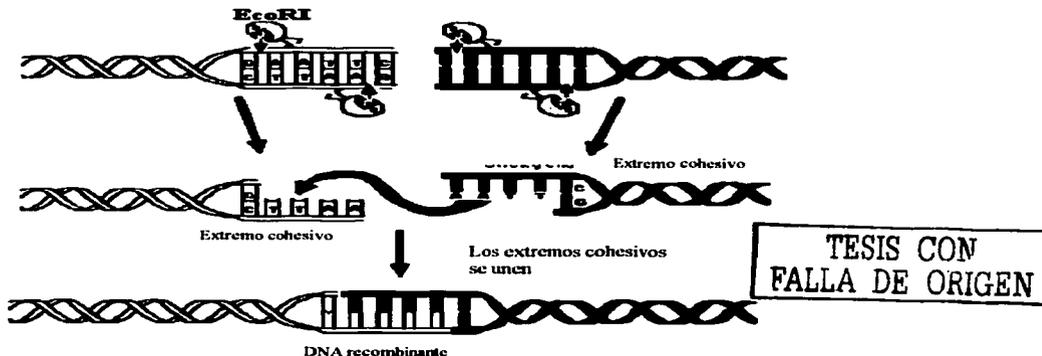


Fig. 124: Acción de la Enzima de Restricción *EcoRI*.¹⁰³

3.3.2 Tipos de Enzimas de Restricción

Existen tres tipos comunes de endonucleasas de restricción:

- a) **Tipo I.-** Reconocen secuencias específicas pero se mueven a lo largo del DNA (aproximadamente 100 – 5000 bases) antes de cortar una de las hebras y liberar un número de nucleótidos (aprox. 75). Se necesita una segunda molécula de enzima para cortar la segunda cadena de DNA. Las endonucleasas de restricción Tipo I están formadas de tres subunidades:
- Una subunidad específica **S**, responsable del reconocimiento de la secuencia.
 - Una subunidad de metilación **M**, la cual metila a la adenina, y
 - Una subunidad de restricción **R**, la cual se inserta en el DNA en un sitio de restricción no metilado.

Estas enzimas requieren ATP, Mg^{2+} y S-adenosilmetionina (SAM) como cofactores para llevar a cabo su función ¹⁰⁷.

- b) **Tipo II.-** Son las mejores conocidas y las más utilizadas en las técnicas de Biología Molecular. Producen fragmentos específicos de DNA y son la clave para la producción de DNA recombinantes. Reconocen una secuencia específica de DNA y cortan ambas cadenas de éste muy cerca de dicha secuencia. Estas enzimas consisten de una proteína que actúa como una enzima de restricción y de una segunda proteína que funciona como metilasa. Los cofactores necesarios para su funcionamiento son Mg^{2+} y ATP.
- c) **Tipo III.-** Tienen propiedades intermedias entre el Tipo I y II. Cortan ambas cadenas de DNA a una distancia definida del sitio de reconocimiento (generalmente 20 a 25 nucleótidos). La actividad requiere ATP y se incrementa con la adición de s-adenosilmetionina. Pocas enzimas se han caracterizado de este tipo ¹⁰⁷.

Dada la importancia de las Endonucleasas de restricción Tipo II en la tecnología del DNA recombinante, se estudiarán con detalle en la siguiente sección.

3.3.3 Enzimas de Restricción Tipo II

Las secuencias reconocidas por endonucleasas de restricción tipo II tienen las siguientes características:

1. Generalmente secuencias de 4-6 pares de bases en DNA de doble cadena; se han identificado recientemente pocos sitios de reconocimiento de 8 pares de bases.
2. Las secuencias son generalmente palindrómicas

Bam HI

5'GGATCC3'
3'CCTAGG5'

3. Las etapas de digestión de la endonucleasa de restricción de DNA son:
- Reconocimiento y enlace de las endonucleasas de restricción a la secuencia blanco del DNA.
 - Orientación del sitio catalítico de la endonucleasa de restricción hacia el sitio de reconocimiento sobre ambas cadenas de DNA.
 - Introducción de los enlaces fosfodiéster entre las bases de cada cadena.
4. La nomenclatura estándar para nucleótidos ambiguos en secuencias de reconocimiento de endonucleasas de restricción es la siguiente:

R = G ó A
 Y = C ó T
 M = A ó C
 K = G ó T
 S = G ó C
 W = A ó T
 H = A ó T ó C
 B = G ó T ó C
 V = G ó C ó A
 D = G ó A ó T
 N = A ó C ó G ó T

5. Han sido identificadas mas de 600 diferentes de enzimas de restricción Tipo II:
- No todas están disponibles comercialmente.
 - Algunas son (isoquimeros)
 - 141 enzimas de restricción tienen 40 especificidades diferentes ¹⁰⁴.

3.3.3.1 Nomenclatura de algunas Endonucleasas de Restricción:

EcoRI E = género *Escherichia*
 co = especie *coli*
 R = cepa *RY13*
 I = primera endonucleasa aislada.

BamHI B = género *Bacillus*
 am = especie *amyloliquefaciens*
 H = cepa *H*
 I = primera endonucleasa aislada

HindIII H = Género *Haemophilus*
 in = especie *influenzae*
 d = cepa *Rd*
 III = tercera endonucleasa aislada.

3.3.3.2 Extremos de Fragmentos de Restricción.

Las endonucleasas de restricción reconocen enlaces fosfodiéster específicos para generar fragmentos de DNA con extremos específicos, extremos salientes 3', ó 5' ó extremos "romos" (Fig. 125, Fig. 126, Fig. 127.) En la Tabla 5 se muestran algunas enzimas de restricción y su especificidad.

1. Ejemplos

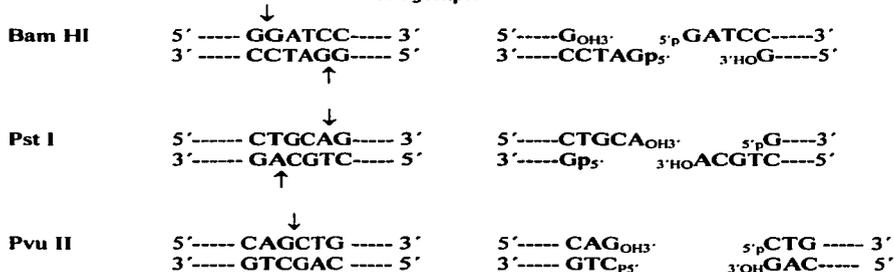


Tabla 5. Especificidades de algunas Endonucleasas de Restricción Típicas.¹⁰⁴

FUENTE	ENZIMA	SECUENCIA DE RECONOCIMIENTO	No. de Sitios de Enclavamiento		
			λ	Adenovirus-2	SV40
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> H	BamHI	G↓GATCC	5	3	1
<i>Bacillus globigii</i>	Bgl II	A↓G[A]TCT	6	12	0
<i>Escherichia coli</i> RY13	Eco RI	G↓AATC	5	5	1
<i>Escherichia coli</i> R245	Eco RII	↓C[C]TGG	>35	>35	16
<i>Haemophilus aegyptius</i>	Hae III	GG↓CC	>50	>50	19
<i>Haemophilus influenzae</i> Rd	Hind II	GTPy↓Pu[A]C	34	>20	7
<i>Haemophilus influenzae</i> Rd	Hind III	A↓AGCTT	6	11	6
<i>Haemophilus parainfluezae</i>	Hpa II	C↓CGG	>50	>50	1
<i>Nocardia oitidiscavarium</i>	Not I	GC↓GGCCGC	0	7	0
<i>Providencia stuartii</i> 164	Pst I	CTGCA↓G	18	25	2
<i>Serratia marcescens</i> S _b	Sma I	CCC↓GGG	3	12	0

Las secuencias de reconocimiento están escritas 5'→3'. Únicamente está representada una cadena. Las flechas indican los sitios de enclavamiento. Pu (purina) denota que tanto A como G serán reconocidas. Py (pirimidina) denota que tanto C como T serán reconocidas. Los paréntesis representan posiciones de nucleótidos en donde las bases pueden ser metiladas.

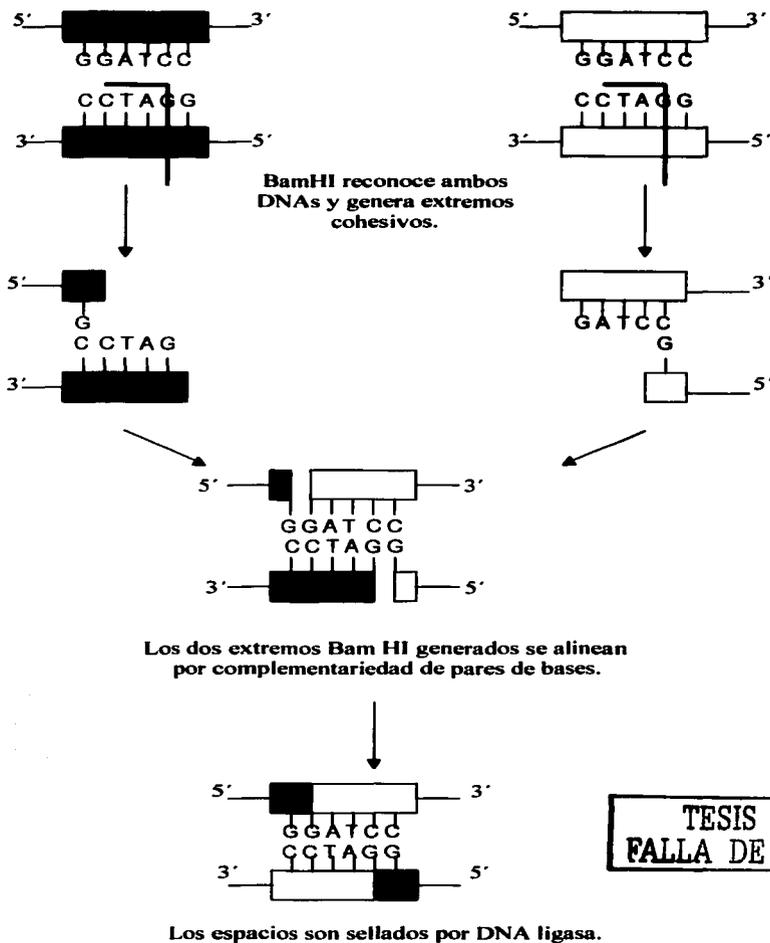
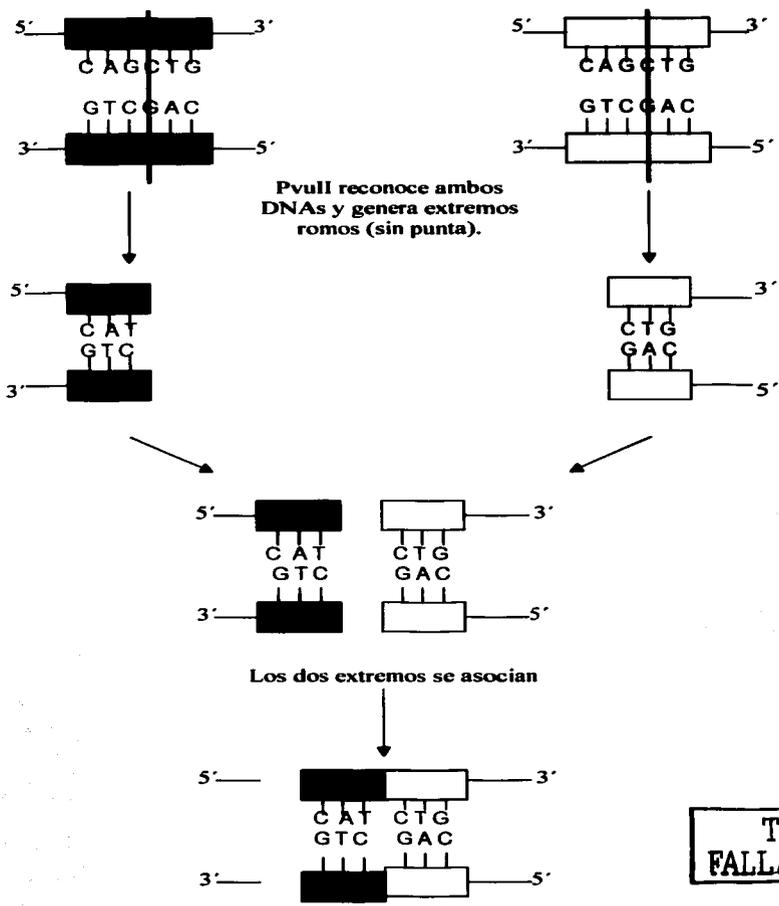


Fig. 125. Cuando dos moléculas diferentes de DNA son cortadas con la misma enzima, se generan los mismos extremos cohesivos. Las dos piezas pueden alinearse por pares de bases complementarias.¹⁰⁴



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Fig. 126. Unión de fragmentos de DNA con extremos romos.¹⁰⁴

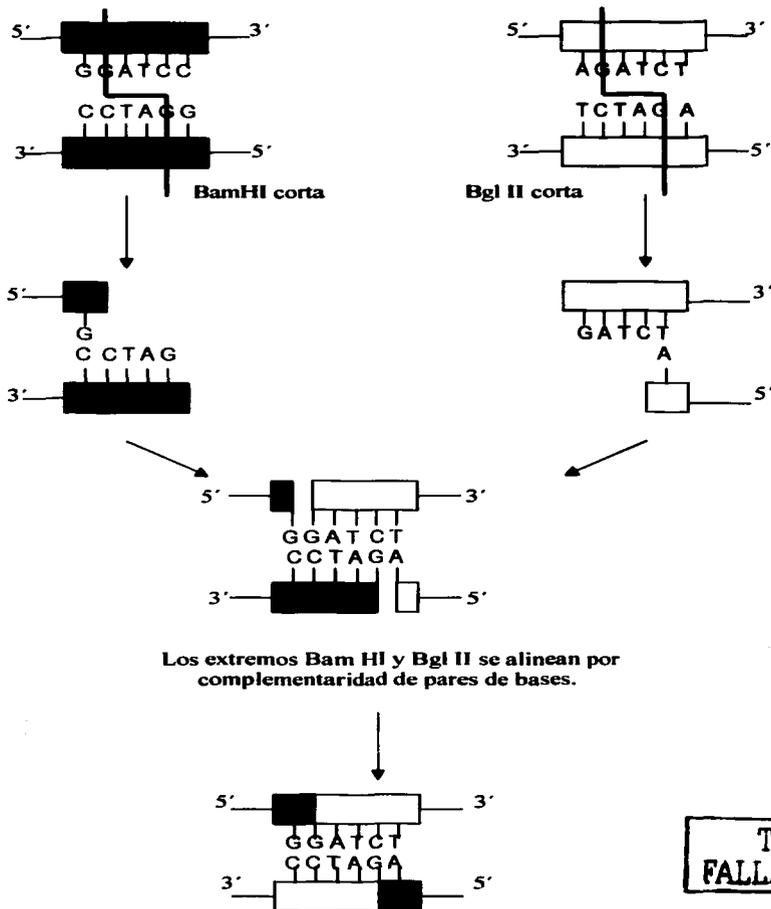


Fig. 127. Dos moléculas de DNA cortadas con dos enzimas diferentes pueden tener extremos compatibles y pueden ser unidos. Los sitios de reconocimiento de restricción para Bam HI y Bgl II no son regenerados.¹⁰⁴

3.3.3.3 Extremos Cohesivos Compatibles

La siguiente tabla enlista grupos de endonucleasas de restricción que generan extremos cohesivos salientes con la misma secuencia. Aquellos enlistados como "no ambiguos" generan sólo el extremo cohesivo enlistado. Aquellos enlistados como "ambiguos" generan múltiples tipos de extremos, se proporciona una secuencia. La fracción exacta depende del tipo de ambigüedad y de la frecuencia del sitio en la especie de DNA que está siendo reconocido¹⁰⁴.

TABLA 6. Clasificación de Extremos en Endonucleasas de Restricción¹⁰⁴

Extremos Salientes	No ambiguos	Ambiguos	M13pUC Sitio de Clonación
5'-CG	<i>Aci I</i> <i>BsaH I</i> <i>Cla I</i> <i>HinP I I</i> <i>Hpa II</i> <i>Mae II</i> <i>Msp I</i> <i>Nar I</i> <i>Nsp V</i> <i>Psp1406 I</i> <i>Taq I</i>	<i>Acc I</i>	
5'-TA	<i>Mae I</i> <i>Mse I</i> <i>Nde I</i> <i>Vsp I</i>		
5'-AATT	<i>Apo I</i> <i>EcoR I</i> <i>Mun I</i> <i>Tsp509 I</i>		<i>Eco R I</i>
5'-AGCT	<i>Hind III</i>		<i>Hind III</i>
5'-CATG	<i>BspH I</i> <i>Neo I</i>	<i>Afl III</i> <i>Dsa I</i> <i>Sec I</i> <i>Sty I</i>	
5'-CCGG	<i>Age I</i> <i>Cfr10 I</i> <i>Kpn2 I</i> <i>PinA I</i> <i>SgrA I</i> <i>Xma 10</i>	<i>Ava I</i> <i>Sec I</i>	<i>Xma I</i>
5'-CGCG	<i>Asc I</i> <i>BssH II</i> <i>Mlu I</i>	<i>Afl III</i> <i>Dsa I</i> <i>Sec I</i>	
5'-CTAG	<i>Avr II</i> <i>Nhe I</i> <i>Spe I</i> <i>Xba I</i>	<i>Sec I</i> <i>Sty I</i>	<i>Xba I</i>
5'-GATC	<i>BamH I</i> <i>Bcl I</i> <i>Bgl II</i> <i>Bsp1407 I</i> <i>BstY I</i> <i>Mbo I</i> <i>Nde II</i> <i>Sau3A I</i>		<i>BamH I</i>
5'-GGCC	<i>Eae I</i> <i>Not I</i> <i>Xma III</i>		
5'-GTAC	<i>Asp718 I</i> <i>Sun I</i>	<i>Ban I</i>	
5'-TCGA	<i>Sal I</i> <i>Xho I</i>	<i>Ava I</i>	<i>Sal I</i>
5'-TGCA	<i>Alw44 I</i>	<i>Sfc I</i>	
5'-TTAA	<i>Afl II</i>		
AT-3'	<i>Pac I</i> <i>Pvu I</i> <i>Xor II</i>		
CG-3'	<i>Hha I</i>		
GC-3'	<i>Sst I</i>		
ACGT-3'	<i>Aat II</i>		
AGCT-3'	<i>Sst I</i>	<i>Alw21 I</i> <i>Ban II</i>	<i>Sst I</i>
CATG-3'	<i>Nla III</i> <i>NspH I</i> <i>Sph I</i>		<i>Sph I</i>
GCGC-3'	<i>Bbe I</i> <i>Hae II</i>		
GGCC-3'	<i>Apa I</i>	<i>Ban II</i> <i>Sdu I</i>	
GTAC-3'	<i>Kpn I</i>		<i>Kpn I</i>
TGCA-3'	<i>Nsi I</i> <i>Pst I</i> <i>Sse8387 I</i>	<i>Alw21 I</i> <i>Sdu I</i>	<i>Pst I</i> <i>Sse8387 I</i>

3.3.3.4 Isoquisómeros

La siguiente tabla enlista isoisquisómeros, enzimas que reconocen la misma secuencia de DNA pero no necesariamente cortan el DNA en el mismo punto. Se proporcionó el sitio de reconocimiento para la enzima, sus isoisquisómeros y los términos o extremos generados (los cuales pueden o no ser los mismos) ¹⁰⁴.

TABLA 7. Algunos Isoquisómeros y sus Similitudes o Diferencias con Enzimas de Restricción.¹⁰⁴

Enzima	Síto de Reconocimiento (5'-3')	Términos ó extremos	Isoquisómeros	Términos ó extremos
<i>Asu II</i>	TTCGAA	Base 2 extensión 5'	<i>Mla I</i>	El mismo
<i>Ava I</i> **	CPyCGPuG	Base 4 extensión 5'	<i>Nsp 7524 III</i>	El mismo
<i>Ava II</i> **	GGCC	Base 3 extensión 5'	<i>Afl I, BamNx, I, Cla II</i> ** <i>Fdi I, HgiB I, HgiC II, HgiE I, HgiH III.</i>	El mismo
<i>BamH I</i> **	↓ 5'GGATCC 3'	Base 4 extensión 5'	<i>Bst I</i>	El mismo
<i>Bbe I</i>	5'GGCGCC 3' ↑	Base 4 extensión 3'	<i>Nar I, Nda I, Nun II</i>	Base 2 extensión 5'
<i>Bcn I</i>	CCGG	Base 1 extensión 5'	<i>Cau II</i>	El mismo
<i>BstE II</i> **	GGTNACC	Base 5 extensión 5'	<i>AspA I, BstP I, Eca I, FspA I.</i>	El mismo
<i>Bvu I</i>	GPuGCPyC	Base 4 extensión 3'	<i>Ban II, HgiJ II</i>	El mismo
<i>Cfr I</i>	PyGGCCPu	Base 4 extensión 5'	<i>Eae I</i>	El mismo
<i>EcoR II</i> **	CCGG	Base 5 extensión 5'	<i>Aor I, Apy I, BstN I, TagXI</i>	Base 1 extensión 5'
<i>Hae III</i> **	GGCC	escindido	<i>BspR I, BsuE I, Clt I, FnuD I, Sfa I.</i>	El mismo
<i>HgiC I</i>	GGPyPuCC	Base 4 extensión 5'	<i>HgiH I</i>	El mismo
<i>HgiD I</i>	GPuCGPyC	Base 2 extensión 5'	<i>Acy I, Aos II, AstW I, Asu III, HgiG I, HgiH II.</i>	El mismo
<i>Hha I</i> **	CCGC	Base 2 extensión 3'	<i>FnuD III, HinP₁ I, SclN I.</i>	El mismo Base 2 extensión 5'
<i>Hind II</i>	GTPyPuAC	Escindido	<i>HindIC I</i>	El mismo
<i>Hind III</i>	AAGCTT	Base 4 extensión 5'	<i>Hsu I</i>	El mismo
<i>Hint I</i> **	GANTC	Base 3 extensión 5'	<i>FnuA I</i>	El mismo
<i>Hpa II</i> **	CCGG	Base 2 extensión 5'	<i>Hap I, Mno I, Msp I</i> **	El mismo
<i>Mst I</i>	TGGCA	escindido	<i>Aos I, Fdi II.</i>	El mismo
<i>Mst II</i>	CCTNAGG	Base 3 extensión 5'	<i>Cvn I, Sau I</i>	El mismo
<i>Nsp7524 II</i>	G(↓)GC(↓)C	Base 4 extensión 3'	<i>NspH I</i>	El mismo
<i>Pst I</i> **	CTGCAG	Base 4 extensión 3'	<i>SalP I, Sfl I.</i>	El mismo
<i>Pvu I</i> **	CGATCG	Base 2 extensión 3'	<i>Nbl I, Rsh I, Xor II*</i>	El mismo
<i>Sal I</i> **	GTGCAC	Base 4 extensión 5'	<i>HgiC III, HgiD II, Nop I.</i>	El mismo
<i>Sau3A I</i> **	GATC	Base 4 extensión 5'	<i>FnuC I, FnuE I, Mbo II, Pfa I, Dpn I (adenina metilada)</i>	Escindido
<i>Sau96 I*</i>	GGNCC	Base 3 extensión 5'	<i>Asu I, Nsp7524 IV'</i>	El mismo
<i>Sma I</i> **	CCCGGG	Escindido	<i>Xma I</i>	Base 4 extensión 5'
<i>Sst I</i> **	GAGCTC	Base 4 extensión 3'	<i>Sac I</i>	El mismo
<i>Sst II</i> **	CCGCGG	Base 2 extensión 3'	<i>Csc I, Sac II</i>	El mismo
<i>Stu I</i>	AGGCT	escindido	<i>Gdi I.</i>	El mismo
<i>Than I</i> **	CCGG	escindido	<i>FnuD II.</i>	El mismo
<i>Xho I</i> **	CTCGAG	Base 4 extensión 5'	<i>Blu I, PaeR7 I, Sla I, Xpa I.</i>	El mismo

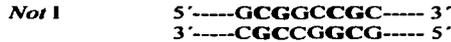
3.3.4 Probabilidad de reconocimiento por endonucleasas de restricción

1. Para una secuencia dada con determinada cantidad de nucleótidos (n) la probabilidad de existencia es (asumiendo aleatoriedad) = $1/4^n$

Secuencia de reconocimiento	Probabilidad de reconocimiento	Tamaño promedio del fragmento de DNA
Base 4	1/256	256 pb
Base 6	1/4096	4096 pb
Base 8	1/65.536	65,536 pb

2. Las secuencias de DNA no son aleatorias:

- a) La secuencia 5'----CG---- 3' es 5 vueltas (dobles de la cadena) mas rara en humanos que lo predicho por las leyes de aleatoriedad.
- b) Las endonucleasas de restricción que reconocen secuencias que contienen 5'---CG---3' son cortadores (cutters) poco comunes, por ejemplo:



El tamaño promedio de fragmentos de DNA genómico humano generados por el reconocimiento de Not I es de aproximadamente 1.5×10^6 pb.

- c) Otras consideraciones de especie dependen del contenido G/C en el DNA genómico.
- d) El uso de un codon por diferentes especies varía y se refleja en la preferencia del nucleótido; la cual afecta el contenido G-C del DNA ¹⁰⁴.

3.3.5 Definición de Unidad.

Una unidad de endonucleasa de restricción es la cantidad de enzima requerida para digerir 1 μ g de sustrato lineal de DNA en 60 minutos con la temperatura y el buffer apropiados.

- ⊙ La mayoría de las enzimas están definidas por el bacteriófago λ de DNA o por DNA plásmido purificado
- ⊙ La densidad en el sitio/ μ g de DNA no debe ser un factor importante debido al exceso de enzima presente.

3.3.6 Factores que afectan la actividad de endonucleasas de restricción.

3.3.6.1 Longitud del tiempo de incubación (Crouse and Amorese, 1986⁶). La siguiente tabla indica la duración de la actividad observada después de la incubación con endonucleasas de restricción por tiempos que van desde 1 a 5 horas. Después de 1 ó 2 horas la mayoría de las enzimas empiezan a perder su actividad. Las incubaciones durante la noche por lo general no son recomendadas ¹⁰⁴.

TABLA 8. Tiempo de Actividad de algunas Endonucleasas de Restricción.^{10*}

Endonucleasa de Restricción	Unidad de sustrato	Actividad (en horas)					Endonucleasa de Restricción	Unidad de Sustrato	Actividad (en horas)				
		1	2	3	4	5			1	2	3	4	5
Acc I	λ	●	●	●	●	●	Mbo II	SV-40	●	●	●	●	●
Afl II	Ad-2	●	●	●	●	●	Mlu I	λ	●	●	●	●	●
Afl III	λ	●	●	●	●	●	Msc I	λ	●	○	○	○	○
Alu I	λ	●	●	●	●	●	Mse I	λ	●	●	●	●	●
Alw21 I	λ	●	●	●	●	●	Msp I	λ	●	●	○	○	○
Alw44 I	λ	●	●	●	●	●	Mun I	λ	●	●	●	●	●
AlwN I	λ	●	●	●	●	●	Nar I	Ad-2	●	●	●	●	●
Apa I	Ad-2	●	●	●	●	●	Nci I	λ	●	●	●	●	●
Ava I	λ	●	●	●	●	●	Nco I	λ	●	●	●	●	●
Ava II	λ	●	●	●	●	●	Nde I	λ	●	●	●	●	●
BamH I	λ	●	●	○	○	○	Nde II	SV40	●	●	●	●	●
Ban II	λ	●	●	●	●	●	NgoA IV	Ad-2	●	●	●	●	●
Bcl I	Ad-2	●	●	●	●	●	Nhe I	Ad-2	●	●	●	●	○
Bgl I	λ	●	●	●	●	●	Not I	Ad-2	●	●	●	●	●
Bgl II	λ	●	●	●	●	●	Nru I	λ	●	●	●	●	●
BpuI 102 I	λ	●	●	●	●	●	Nsi I	λ	●	●	○	○	○
BsaH I	λ	●	●	●	●	●	Nsp I	λ	●	●	○	○	○
BsaJ I	λ	●	●	●	●	●	Nsp V	λ	●	●	●	●	●
Bsm I	λ	●	●	○	○	○	PinA I	λ	●	●	●	○	○
BssH II	λ	●	●	○	○	○	Psp5 II	λ	●	●	●	●	●
BstE II	λ	●	●	●	●	●	Pst I	λ	●	●	○	○	○
BstX I	λ	●	○	○	○	○	Pvu I	Ad-2	●	●	●	●	●
BstY I	λ	●	●	●	●	●	Pvu II	λ	●	●	●	●	○
Cfo I	λ	●	○	○	○	○	Rca I	λ	●	○	○	○	○
Cfr10 I	λ	●	●	●	●	●	Rsa I	λ	●	●	○	○	○
Cla I	λ	●	●	●	●	●	Rsr II	λ	●	●	●	●	●
Cvn I	λ	●	●	○	○	○	Sal I	Ad-2	●	●	●	●	●
Dde I	λ	●	●	●	●	●	Sau3A I	λ	●	●	○	○	○
Dpn I	pBR322	●	●	●	●	●	Sau96 I	Ad-2	●	●	●	●	●
Dra I	λ	●	●	○	○	○	Sca I	λ	●	○	○	○	○
Eco47 III	λ	●	●	●	●	●	Sfi I	Ad-2	●	●	●	●	●
EcoO109 I	λ	●	●	●	●	○	Sma I	Ad-2	●	●	●	●	○
EcoR I	λ	●	●	●	●	●	Spe I	Ad-2	●	●	●	●	●
EcoR II	Ad-2	●	●	○	○	○	Sph I	λ	●	○	○	○	○
EcoR V	λ	●	●	●	●	○	Ssp I	λ	●	●	●	●	●
Fap I	λ	●	●	●	●	●	Sst I	Ad-2	●	●	●	●	●
Hae II	λ	●	●	●	●	●	Sst II	Ad-2	●	●	●	●	●
Hae III	λ	●	●	●	●	●	Stu I	λ	●	●	●	●	●
Hha I	λ	●	●	●	○	○	Sty I	λ	●	○	○	○	○
Hinc II	λ	●	●	●	●	●	Sun I	φX174	●	●	●	●	●
Hind III	λ	●	●	●	●	●	Taq I	φX174	●	●	●	●	●
Hinf I	λ	●	●	●	○	○	Tha I	λ	●	●	○	○	○
Hpa I	λ	●	●	●	●	●	Vsp I	λ	●	●	●	●	●
Hpa II	λ	●	●	●	●	●	Xba I	Ad-2	●	●	●	●	●
Kpn I	Ad-2	●	●	○	○	○	Xho I	Ad-2	●	●	●	●	●
Kpn2 I	λ	●	○	○	○	○	Xma III	Ad-2	●	●	●	●	●
Mbo I	SV-40	●	●	●	●	●	Xor II	Ad-2	●	●	●	●	●

● actividad completa

○ actividad parcial

○ sin actividad

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

3.3.6.2 Buffer

I. Utilizar buffers recomendados.

- (1) Buffers REACT®.- Cada enzima es probada y proporcionada con el buffer de reacción.
- (2) El reactivo está comprendido normalmente de un buffer (Tris), un catión divalente (Mg^{2+}) y una sal (Na/K); de manera opcional, se añaden agentes reductores (β -ME, DDT) y agentes estabilizadores (BSA) ¹⁰⁴.

TABLA 9. Buffers REACT a concentración 1X.¹⁰⁴

Nombre	Tris-HCl (mM)	pH	MgCl ₂ (mM)	NaCl (mM)	KCl (mM)
REACT 1	50	8.0	10	---	---
REACT 2	50	8.0	10	50	---
REACT 3	50	8.0	10	100	---
REACT 4	20	7.4	5	---	50
REACT 5	10	8.2	8	---	---
REACT 6	50	7.4	6	50	50
REACT 7	50	8.0	10	50	50
REACT 8	20	7.4	10	---	---
REACT 9	---*	7.9	---**	---	---***
REACT 10	100	7.6	10	150	---

*20 mM Tris-acetato

**10mM Mg-acetato

***50mM K-acetato

Nota: Los buffers REACT se proporcionan como concentrados 10x. Los buffers REACT no contienen el componente lábil DTT. Este componente es requerido en la reacción de EcoR II, Nde II y Rsr II, debe ser agregado a la reacción a una concentración final de 1 mM, como se establece en las especificaciones del producto. Se proporciona un bial de 10 mM de DTT con estas enzimas.

II. Un buffer inapropiado puede:

- (2) Afectar la actividad de restricción de la endonucleasa.
- (3) Afectar las actividades de contaminación. LTI efectúa una digestión con exceso de 200 vueltas en la mayoría de las enzimas para asegurar la ausencia de las actividades contaminantes (exceso de 10 vueltas de enzima por 20 horas de incubación); éstas son probadas sólo con el buffer recomendado.
- (4) Inducir el "inicio" de actividad-pérdida de especificidad del sitio. Eco RI va desde un corte de 6 bases (secuencia de reconocimiento GAATTC), a un corte de 4 bases (secuencia de reconocimiento AATTCN) ¹⁰⁴.

3.3.6.3 DNA

- I. **Forma física** – linear versus súper enrollado ¹¹². Algunas enzimas son afectadas por accesibilidad limitada para sitios de reconocimiento en DNAs súper enrollados.
- II. **Pureza** – sales contaminadas y/o proteínas pueden afectar las actividades enzimáticas. Esto puede ser un problema cuando se utiliza DNA a partir de una miniprep.
- III. Algunas enzimas son sensibles a la metilación de bases específicas en la secuencia de reconocimiento. La fuente de DNA puede influenciar la cantidad y tipo de metilación.
- IV. Algunas enzimas son sensibles a secuencias que flanquean la secuencia de reconocimiento.

3.3.6.4 Solventes no polares (etanol, cloroformo, fenol, glycerol, etc)

- a) Inactivan a las enzimas.
- b) Promueven la actividad de inicio.

3.3.6.5 Un número excesivo de unidades puede promover la actividad de inicio (>10 unidades/ μg).

3.3.7 Guía Para la digestión con endonucleasas de restricción.

- ⊙ Concentración de glicerol $\leq 5\%$ - la mayoría de las enzimas son almacenadas en glicerol al 50% a 20° C, por lo tanto la enzima debe contener $\leq 10\%$ de volumen de reacción.
- ⊙ Evitar usar más de 10 unidades/ μg de DNA.
- ⊙ La concentración óptima de DNA plásmido debe ser aproximadamente 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.
- ⊙ Las concentraciones de DNA genómico deben ser reducidas posteriormente, si existe alguna dificultad para obtener una digestión completa.
- ⊙ Checar la estabilidad de la enzima para digestiones > 1 hora.
- ⊙ Realizar una doble digestión únicamente cuando el mismo buffer es recomendado para cada enzima o si una enzima tiene actividad considerable en otro buffer ¹⁶⁴.

- Si se requieren diferentes buffers, realizar una extracción con fenol/cloroformo y una precipitación con etanol antes de la segunda digestión (la extracción del DNA biotinilado con fenol/cloroformo dará como resultado la retención del DNA en la interfase orgánica/acuosa).

- La interferencia entre dos enzimas puede dar como resultado una digestión incompleta.
- La proximidad de los sitios de corte puede efectuar digestiones dobles.

3.3.8. Protocolo para la Digestión con Enzimas de Restricción

1. Preparar la reacción para digestión añadiendo los siguientes reactivos en el orden listado en un tubo para microcentrífuga:

Reactivo	Cantidad
H ₂ O dd estéril	Cantidad suficiente
Buffer para el ensayo 10x	1/10 volumen
DNA	x μ l
Enzima de restricción*	y μ l(1-10 unidades por μ g DNA)
Volumen Total	Z μ l

NOTA.- El volumen de reacción depende de la cantidad y tamaño del DNA que está siendo digerido. DNAs muy grandes deben ser digeridos en volúmenes totales grandes (entre 50 – 100 μ l).

2. Mezclar suavemente por medio de pipeteo e incubar la reacción a la temperatura apropiada (normalmente 37° C por 1 – 3 Hrs).
3. Inactivar la enzima(s) calentando a 70 – 100° C por 10 min o por medio de extracción con fenol (leer el catálogo del fabricante para determinar el grado de inactivación por calor según la enzima). Antes de utilizar protocolos subsecuentes como desfosforilación o uso de ligasas debe utilizarse una alícuota de la solución de digestión para electroforesis en gel de agarosa contra una muestra de DNA no digerido y un marcador de tamaño, si es necesario.

* Si se desea puede utilizarse más de una enzima para la digestión de una muestra siempre y cuando ambas enzimas sean activas en el mismo buffer y a la misma temperatura.

Referirse al catálogo del fabricante para consultar la carta de actividad enzimática en un rango de concentraciones salinas para escoger el buffer apropiado (Buffer Salino de concentraciones bajas 10X , medias 10X, altas 10X o buffers para digestiones pequeñas). Las enzimas de restricción se adquieren con los siguientes fabricantes: Bethesda Research Laboratories, New England Biolabs o United States Biochemicals ¹⁰⁸.

3.3.9 Manejo y Almacenamiento de Enzimas de Restricción.

- a. Almacenar a -20°C en un congelador especial. Mantener en hielo cuando no estén en el congelador.
- b. Tan pronto como se haya terminado de usar la enzima, regresarla al congelador a -20°C .
- c. Evitar la contaminación cruzada de las enzimas.
- d. Microcentrifugar rápidamente el tubo antes de remover la alícuota de la enzima ¹⁰⁴.

3.4 Separación de DNA por medio de Electroforesis en Gel

La separación de ácidos nucleicos mediante electroforesis en gel se basa en principios similares a los que operan durante el fraccionamiento de proteínas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio. A diferencia de las proteínas, todas las moléculas de ácido nucleico, cualquiera que sea su longitud, tienen una densidad de carga similar (número de cargas negativas por unidad de masa) y, por lo tanto, todas tienen un potencial equivalente para desplazarse en un campo eléctrico. El gel de poliacrilamida o de agarosa suministra la resistencia necesaria para el desplazamiento, de modo que cuanto mayor sea el peso molecular de una molécula de RNA o DNA, mas lentamente se desplaza a través del gel. La sensibilidad de la electroforesis en gel es tan grande que con esta técnica se pueden separar moléculas de DNA o RNA que sólo difieren por un nucleótido. La Fig. 128 muestra un ejemplo de ello ⁵⁸.

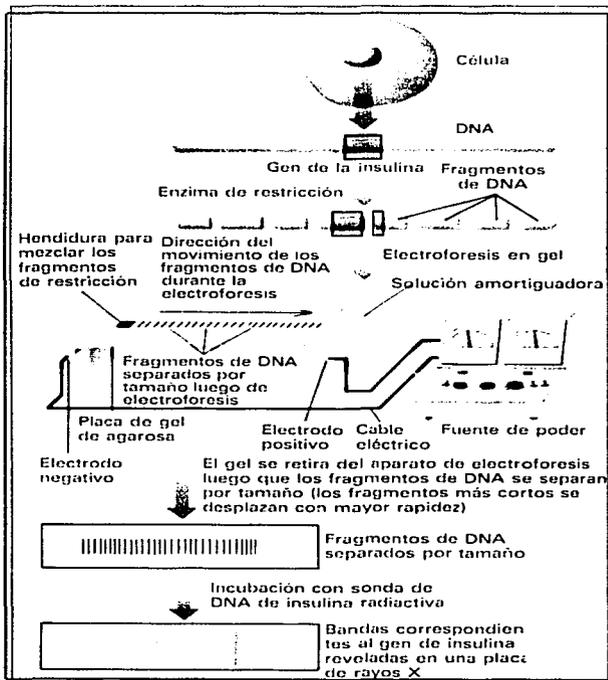


Fig. 128. Identificación de los fragmentos obtenidos por restricción que contienen la secuencia de nucleótidos del gen de insulina.⁵⁸

3.4.1 Objetivo.

- ▶ Fraccionar los ácidos nucleicos basándose en el tamaño (longitud) y conformación física.
- ▶ Determinar el tamaño y abundancia de un fragmento conforme a estándares.
- ▶ Determinar la presencia o ausencia de fragmento(s) específico(s).
- ▶ Purificar el/los fragmento(s).

En la Fig. 129 se muestran diagramas de aparatos para electroforesis.

3.4.2 Protocolo

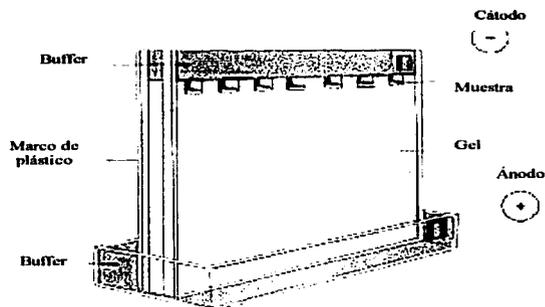
1. La agarosa seca se disuelve en el buffer apropiado calentándola en un microondas por 2-4 minutos en un matraz erlenmeyer de 500 ml. Se prepara según la fórmula que se proporciona*.

	0.7%	1.0%	2.0%
Agarosa	1.05 g	1.5 g	3.0 g
TAE 20X	7.5 ml	7.5 ml	7.5 ml
H₂O	142.5 ml	142.5 ml	142.5 ml
EtBr (5 mg/ml)	25 µl	25µl	25µl
Volumen Total	150 ml	150 ml	150 ml

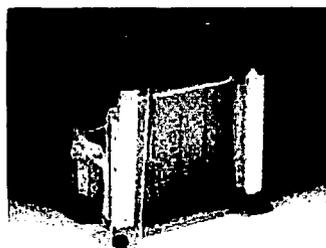
* Agarosa grado Tecnológico (No. 800669) o Gel a baja temperatura (No. 800259), marca Schwarz/Mann Biotech.

2. Añadir TAE 20x y Bromuro de Etidio, agitar para mezclar y vaciar el gel en un molde. El molde se puede hacer pegando cinta adhesiva transparente en los bordes de una placa de vidrio de 18 x 10 cm, la cual tiene una especie de "peines" en ambos lados de la placa. Dejar de 20 – 30 min para solidificar.
3. Remover cuidadosamente la cinta y los "peines", colocar el gel en una cámara de electroforesis horizontal. Añadir buffer para electroforesis TAE 1X al reservorio hasta que cubra el gel de agarosa.
4. A cada muestra de DNA añadir al menos 1/10 de volumen de colorante para gel de agarosa 10X, mezclar y cargar en los pozos.
5. Iniciar la electroforesis a 150 – 200 mA hasta que se logre la separación, esto ocurre generalmente entre 0.5 – 1 Hr. (Para geles de agarosa a baja temperatura utilizar 100 – 120 mA). Durante la electroforesis enfriar el gel con un ventilador.
6. Visualizar los fragmentos de DNA con luz UV de onda larga y fotografiar con una cámara Polaroid ¹⁰⁸.

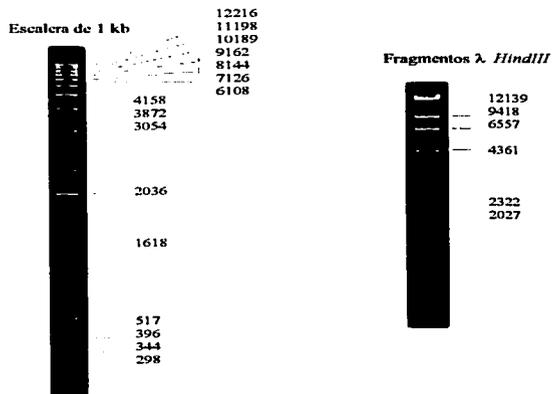
NOTA.- El porcentaje de agarosa en el gel puede variar. Aunque se utilizan generalmente geles al 0.7%, en casos donde se requiere fraccionar moléculas de DNA menores a 1 kb se utilizan geles de agarosa al 1, 1.5 o 2%, dependiendo del tamaño esperado de los fragmentos ¹⁰⁸.



a)



b)



c)

Fig. 129. a) Diagrama de un aparato de gel vertical que muestra sus componentes.

b) Equipo comercial de electroforesis en gel.

c) La esclera de 1 kilobase es un gel electroforético que contiene una serie de fragmentos de DNA de tamaño conocido. Los números indican el número de pares de bases que contiene cada fragmento. Los fragmentos más pequeños se desplazan una mayor distancia. El gel de la derecha muestra los fragmentos que se originan cuando el fago lambda es digerido con la enzima de restricción *HindIII*.¹⁰²

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

3.4.3. Características de la electroforesis de DNA

3.4.3.1 Migración de moléculas de DNA en geles.

Las moléculas de DNA migran a través de una matriz de gel hacia el ánodo durante la electroforesis debido a los fosfatos cargados negativamente a lo largo del esqueleto de DNA. Durante la electroforesis linear el DNAds migra con una orientación extremo a extremo paralela al flujo actual. El índice de migración es afectado no sólo por la porosidad de la matriz del gel sino también por la resistencia de la molécula del DNA al pasar a través del gel ¹⁰⁴.

3.4.3.1.1 Parámetros que afectan el índice de migración.

1. *Tamaño molecular del DNA*

- a. La carga para el radio de masa es la misma para moléculas de DNA de diferentes longitudes, por lo tanto el tamaño determina el índice de migración.
- b. Los índices de migración de moléculas de DNA linear duplex son inversamente proporcionales al logaritmo de sus pesos moleculares a voltajes bajos. (DNA>2kb resuelve óptimamente a <5V/cm).
- c. La abundancia de DNA por línea afecta el índice de migración, de manera que una concentración de DNA mayor de 500 ng por 0.5 cm de línea (fragmento de DNA de una hebra) en un bloque de gel horizontal estándar de 3-5 mm sobrecargará la línea y dará como resultado contaminación y arrastre de DNA de alto peso molecular; sin embargo la endonucleasa de restricción digiere de 20 a 30 µg de DNA genómico que puede ser cargado fácilmente en una sola línea sin problemas de resolución ¹⁰⁴.

2. *Forma física.*

Casi circular, con hendidura circular ó DNA linear de doble cadena del mismo peso molecular tienen diferentes índices de migración. La migración relativa de estas diferentes conformaciones de DNA plásmido son como se muestra a continuación de la más lenta a la más rápida:

- Hendido, circular (Forma II)
- Linear (Forma III)
- Superenrollado (Forma I)

3. La presencia de *bromuro de etidío* en el gel alterará los índices de migración relativa de las diversas formas de DNA. La movilidad de las formas de DNA también es afectada principalmente por la concentración de agarosa y de manera secundaria por el buffer, fuerza iónica, densidad del DNA (concentración del DNA en la línea o banda).

4. **Concentración de agarosa o acrilamida.**- Al incrementarse la concentración de agarosa o acrilamida disminuye el índice de migración, debido a que el tamaño de los poros (porosidad) disminuye con el incremento de la concentración de agarosa o poliacrilamida.
5. Una **concentración de sal** en la muestra de DNA > 250 mM retarda la migración del DNA.
6. **Geles de agarosa:** rango efectivo de separación ¹⁰⁴.

TABLA 10. Rango de Separación de DNA según la concentración de Agarosa en el Gel.¹⁰⁴

Gel (%)	DNA linear (No. de pb)*
0.3	5,000 – 60,000
0.6	1,000 – 20,000
0.7	800 – 10,000
0.9	500 – 7,000
1.2	400 – 6,000
1.5	200 – 4,000
2.0	100 – 3,000

* Tomado de Sambrook, J., Fritsch, E.F and Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

3.4.3.2 Tipos de Agarosa:

La agarosa es un biproducto de algas y es un polímero lineal de D-galactosa con un puente a 3,6-anhidro L-galactosa.

- 1) **Agarosa (Ultrapura).**- >99.5% pura; buena para la mayoría de las aplicaciones.
- 2) **Agarosa LMP (Bajo punto de fusión).**- Útil para el aislamiento de DNA de geles.
- 3) **Agarosa NuSeive™(FMC).** Más soluble que la agarosa convencional
 - (a) Son posibles concentraciones más altas de geles (hasta 9%)
 - (b) Permite un aumento en la resolución de fragmentos de DNA muy pequeños.
 - (c) El bandeo de DNAs pequeños es muy difuso.
 - (d) Los geles son extremadamente frágiles.
- 4) **Agarosa Low EEO (electroendosmosis)**
 - (a) Movilidad electroforética más rápida; útil principalmente para aplicaciones en gel de campo por pulsos. (50% más rápido).

(b) La electrofóresis convencional es sólo 10% más rápida, costos más altos limitan el uso de esta técnica ¹⁰⁴.

3.4.3.3 Geles de Poliacrilamida: rango efectivo de separación para DNA

TABLA 11. Rango de Separación de DNA según la concentración de Poliacrilamida en el Gel.¹⁰⁴

Gel (%)	DNA linear (No. de pb)*
3	100 – 2,000
5	80 – 500
8	60 – 400
12	40 – 200
15	25 – 150
20	1 – 100

* Tomado e Sambrook, J., Fritsch, E.F and Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

3.4.3.3.1 Geles de Poliacrilamida (la acrilamida se refiere a la forma monomérica)

En presencia de persulfato de amonio y TEMED (radical libre y estabilizador, respectivamente), ocurre la polimerización de acrilamida en cadenas. La inclusión de bis-acrilamida en la reacción de polimerización da como resultado un cross linking (enlace cruzado) de las cadenas. La porosidad está determinada por la longitud de la cadena la cual es afectada por la concentración de acrilamida (3-20%) y la cantidad de cross-linking (acrilamida.:bis radio; 29:1 para ácidos nucleicos) ¹⁰⁴.

3.4.3.3 Voltaje Aplicado.

- Voltajes Bajos.- El índice de migración de moléculas de DNA es proporcional al voltaje aplicado.
- Voltaje Alto.- El índice de migración de moléculas de DNA grandes se incrementa de manera diferencial.
- La separación óptima de fragmentos grandes (>10kb) en geles de agarosa ocurre a concentraciones de agarosa bajas (agarosa al 0.5%) y con voltajes bajos (~ 5V/cm).

3.4.3.4 Buffers para Electrofóresis.

- ▶ TBE (Tris, borato, EDTA): 100 mM Tris, 90 mM ácido bórico, 2 mM EDTA (pH 8.3); mejor capacidad de amortiguamiento que TAE.
- ▶ TAE (tris, acetato, EDTA): 40 mM de Tris acetato, 1 mM EDTA (pH 8.0).

3.4.4 Condiciones para la Electrofóresis.

3.4.4.1 Agarosa

- a) TBE < 20 V/cm
TAE < 5 V/cm
- b) Comigración con marcadores de tinción. El Azul de Bromofenol (BPB) y el xileno cianol (XCFF) son comúnmente utilizados en el buffer de la muestra para rastrear la electrofóresis. En geles de agarosa con TBE, BPB migra a \approx 300 pb, mientras que con xileno cianol migra a \approx 4000 pb ¹⁰⁴.
- Geles no desnaturalizantes > 8 V/cm
 - Geles desnaturalizantes (por ejemplo: geles secuenciadores de DNA) que contienen urea, aproximadamente 40 V/cm, 40mA.
- c) Co-migración con marcadores de tinción:

TABLA 12. Co-Migración de DNA con Marcadores de Tinción.¹⁰⁴

% Acrilamida	Nativo (pb)		Desnaturalizante (pb)	
	BPB	XCFF	BPB	XCFF
4	100	500	30	150
5	75	250	27	130
6	60	200	25	100
8	50	175	20	75
10	40	150	10	50
12	25	75	9	40
20	10	50	8	30

3.4.5 Detección de Fragmentos de DNA.

3.4.5.1 Tinción de Bromuro de Etidio.- Detecta 1 ng DNA (5 ng en geles de agarosa)

- Excitación de bromuro de etidio a 260 – 360 nm.
- Emisión de bromuro de etidio a 560 nm (rojo – naranja)
- El bromuro de etidio retarda la migración de DNA en geles.

3.4.5.2 Hibridación molecular.- Detecta < 1pg de DNA. Se explicará con más detalle en la sección 3.5.

3.4.6 Determinación de Peso Molecular.

Compara la movilidad del fragmento de interés con las movilidades de hebras de DNA estándar.

- a) La distancia migrada en la gráfica versus el logaritmo del Peso Molecular de estándares de DNA.
- b) Determinar la distancia migrada para el fragmento de interés e interpolar el peso molecular de la gráfica de estándares de DNA ¹⁰⁴.

3.4.7 Aislamiento de fragmentos de DNA de agarosa.

Los fragmentos específicos de DNA generados por reconocimiento de una endonucleasa de restricción pueden ser purificados de la agarosa por una variedad de métodos. Las preparaciones comerciales de agarosa pueden contener contaminantes que interfieren con las reacciones enzimáticas. Se debe ser cuidadoso para purificar completamente el DNA y obtenerlo libre de impurezas de agarosa ¹⁰⁴.

3.4.7.1 Electroelución.

Este es posiblemente el mejor método cuando se tratan grandes cantidades de DNA (>50 µg) o largos fragmentos de DNA (>5 kb).

1. Retirar la placa de agarosa que contiene la banda de interés, colocarla en un tubo de diálisis, llenar con buffer TAE (pH 8.0): Tris-acetato (40 mM), EDTA 1mM.
2. Someter a electrofóresis de 2 a 3 Hrs a 5 V/cm, monitorear la elusión con una lámpara UV manual de onda corta.
3. Revertir la polaridad de la electrofóresis durante 1 minuto o agitar la bolsa para disociar el DNA eluido de la pared del tubo.
4. El DNA es purificado y concentrado por medio de:
 - Extracción orgánica y precipitación con etanol.
 - Cromatografía DEAE y precipitación de etanol, o
 - Ambas, cromatografía y extracción orgánica (y precipitación con etanol) ¹⁰⁴.

3.4.7.2 Recuperación de DNA a partir de geles de agarosa de bajo punto de fusión.

Estas preparaciones de agarosa tienen grupos hidroxietilo introducidos en las cadenas de polisacárido y ocasionan que la agarosa se convierta en gel a aproximadamente 30° C y se funde a 65° C (bajo la temperatura de fusión de la mayoría de los DNAs de doble cadena).

1. Verter el gel de agarosa de bajo punto de fusión(LMP), enfriar a 4° C para asegurar la solidificación.
2. Después de la electrofóresis de la muestra a 4° C, retirar la banda de DNA en agarosa, añadir 5 volúmenes de Tris 20 mM, EDTA 1mM (pH 8.0) e incubar por 5 minutos a 65° C en un tubo cerrado.
3. Enfriar a temperatura ambiente y extraer con un volumen igual de fenol saturado con buffer.
4. Remover la fase acuosa y re-extraer con fenol:cloroformo, después cloroformo, después precipitar la fase acuosa con etanol.
5. Puede necesitarse purificar el DNA por Cromatografía DEAE para remover las impurezas de la agarosa que puedan inhibir a las enzimas ¹⁰⁴.

3.4.7.3 Método de Adherencia "Glass" (GlassMax, BRL)

Estos productos explotan la adherencia no específica del DNA al vidrio en soluciones. En presencia de NaI (el cual actúa como un agente quiotrópico), la agarosa se disuelve con calor y el DNA es recuperado por adherencia en capas de vidrio o discos de fibra de vidrio. El DNA es eluido en agua o buffer que contenga bajo contenido de sal. (Ver Fig. 123.)

3.4.7.4 Electrofóresis en membrana de celulosa DEAE (Dretzen, et al., 1981).

Este método es ideal para pequeñas cantidades de DNA de doble cadena (ng) de menos de 15 kb en tamaño.

- a) Los fragmentos de DNA son separados por electrofóresis, teñidos con bromuro de etidio, y visualizados con luz UV, una capa es hecha en la agarosa directamente en frente de la banda de interés.
- b) Se corta un pedazo de papel de celulosa DEAE ligeramente mas grande que la abertura y se inserta para que la electrofóresis continúe.
- c) El papel se remueve únicamente cuando el DNA de interés ha migrado sobre éste, después se lava con buffer bajo en sales para remover las impurezas de agarosa.
- d) El DNA es eluido con buffer alto en sales y purificado por extracción orgánica y precipitación con etanol ¹⁰⁴.

3.4.8 Aislamiento de fragmentos de DNA de poliacrilamida.

El DNA aislado directamente de poliacrilamida es de alta pureza y libre de contaminantes que puedan inhibir las enzimas.

3.4.8.1 Método "Cruz and Soak".

La simplicidad y adecuación de este método son claros. La técnica fue originalmente descrita por Maxim and Gilbert (1977) y es adecuado tanto para DNA de una hebra o de doble cadena (30% de recuperación).

- a) Después de la electrofóresis, teñir con bromuro de etidio, iluminar con luz UV de larga longitud de onda, retirar la acrilamida que contiene la banda de interés, y añadir 1-2 volúmenes de buffer de elución (TE).
- b) Apretar la pieza de acrilamida con una varilla de vidrio, incubar a 37° C con agitación por 2-3 horas para obtener fragmentos pequeños de DNA (<500pb) e incubar durante toda la noche para obtener fragmentos grandes.
- c) Remover las piezas de acrilamida por centrifugación y después pasarla sobre una columna de vidrio siliconizada o cromatografía en columna de DEAE.
- d) Concentrar el DNA por precipitación con etanol y sal.

3.4.8.2 Electroelución.- Es posible para acrilamida pero es poco común.

3.4.8.3 Electrofóresis en membrana de celulosa DEAE.

El fragmento de acrilamida removido se coloca junto al papel de celulosa DEAE y se inserta en una abertura de un gel de agarosa. El aislamiento del DNA obtenido es el mismo que se describió anteriormente ¹⁰⁴.

3.5 Hibridación de Ácidos Nucleicos

La Hibridación de Ácidos Nucleicos es un término para describir varias técnicas basadas en el principio de la complementariedad. Esta propiedad permite identificar las macromoléculas de interés entre un gran número de otras moléculas. La complementariedad es el reconocimiento de una secuencia específica o de una forma específica que ocurre cuando dos moléculas se unen. Por ejemplo, las dos cadenas de una doble hélice de DNA se unen porque tienen secuencias complementarias; de manera similar un anticuerpo se une a una región de una proteína porque tienen formas complementarias^{58, 102}.

Siendo la función principal de estas técnicas la identificación se establecen como parte necesaria del protocolo a seguir para crear moléculas de DNA recombinante. Una vez que se han obtenido los fragmentos de DNA en un gel de acrilamida por electroforesis la banda o sección que contiene el fragmento deseado se puede localizar mediante técnicas de hibridación¹⁰².

En solución, es posible obtener híbridos. Un híbrido es un complejo molecular formado por una "sonda molecular", es decir, una secuencia o molécula marcada radioactivamente o mediante una enzima y un "blanco", esto es, la secuencia o molécula que está siendo reconocida y a la cual se une la sonda. Refiriéndonos a los ácidos nucleicos pueden existir los siguientes tipos de híbridos:

- 1) **DNA-DNA.-** Una sonda de DNA de cadena simple (DNAss) puede formar un híbrido de doble cadena con una secuencia "blanco" de DNA de cadena simple si la secuencia de la sonda es complementaria a la secuencia "blanco".
- 2) **DNA-RNA.-** Una sonda de DNA de cadena simple (DNAss) puede formar un híbrido DNA-RNA con una cadena "blanco" de RNA si la secuencia de la sonda es complementaria a la secuencia "blanco" de RNA.
- 3) **Proteína-Proteína.-** Una sonda molecular formada por un anticuerpo (los anticuerpos son proteínas) puede formar un complejo con una molécula proteínica "blanco" si el sitio de unión al antígeno del anticuerpo puede unirse a un epítipo (región antigénica pequeña) sobre la proteína "blanco". En este caso el híbrido es llamado complejo antígeno-anticuerpo¹¹⁰.

3.5.1 Características importantes de la hibridación de ácidos nucleicos

- **Las reacciones de hibridación son específicas.**
La sonda se unirá solamente a los "blancos" con secuencias complementarias (en el caso de anticuerpos se unirá a sitios con la forma tridimensional correcta).
- **Las reacciones de hibridación ocurrirán en presencia de grandes cantidades de moléculas similares pero no idénticas al "blanco".**
Una sonda es capaz de encontrar a una molécula "blanco" en una mezcla de millones de moléculas similares pero no complementarias.

Estas técnicas son importantes porque una célula contiene cientos de miles de genes, miles de moléculas de RNAm y miles de proteínas diferentes. Cuando una célula se abre para extraer el DNA, RNA o alguna proteína el resultado es una mezcla compleja de todas estas moléculas. Es imposible estudiar un gen específico, RNA o proteína en tal mezcla. Junto con otras técnicas de

Biología Molecular, las técnicas de hibridación permiten seleccionar la molécula de interés en una compleja mezcla celular ¹¹⁰.

3.5.2 Clasificación de las Técnicas de Hibridación

La clasificación de las técnicas de hibridación y el nombre de estas se basa en la molécula “blanco”

- * **Southern Blot**
El DNA se corta con enzimas de restricción, la sonda utilizada es de DNA radioactivo.
- * **Northern Blot**
Para identificación de RNA, se utilizan sondas de DNA o RNA radioactivo.
- * **Western Blot**
Para proteínas, la sonda utilizada es de anticuerpos marcados radioactiva o enzimáticamente.

3.5.3 Descripción del Proceso de Hibridación

La formación de híbridos en solución es de poco valor experimental. Si se mezcla una solución de DNA con una solución de sonda radioactiva se obtendrá una solución de sonda radioactiva. No se podrá distinguir a los híbridos de las moléculas no hibridizadas. Por esta razón debe separarse físicamente la mezcla de moléculas antes de la incubación con la sonda. Estas moléculas deben ser inmovilizadas en un soporte sólido, de modo que permanezcan en una sola posición durante la incubación con la sonda. Después de agregar ésta y de incubar se remueve la sonda que no se halla unido específicamente. Posteriormente se detecta la sonda que si se unió y el lugar en donde esto ocurre corresponde a la localización de la molécula blanco inmovilizada. En la Fig. 130 se esquematiza este proceso. Para el caso de Southern, Northern y Western Blots, la separación inicial de moléculas se realiza en base al peso molecular (En clonación se realiza de diferente manera) ¹¹⁰.

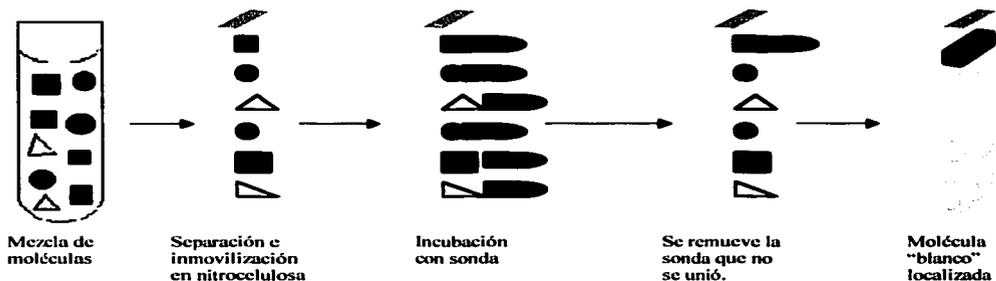
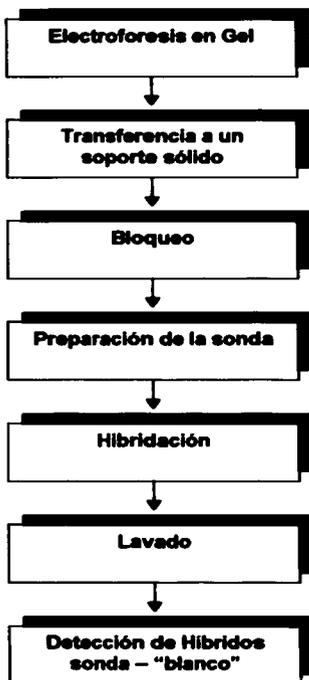


Fig. 130. Diagrama de un Proceso de Hibridación. ¹¹⁰

El proceso anteriormente descrito de manera general tiene la siguiente metodología específica ¹¹⁰.
(Fig. 131 ⁽¹¹⁰⁾)



Cada uno de estos procesos se explicará de manera más detallada a continuación

3.5.4 Electroforesis en Gel.

Anteriormente en el apartado 3.4 se hizo una descripción detallada de las características y protocolos de esta técnica, por lo que en esta sección sólo consideraremos los aspectos importantes en el caso de las muestras que serán sometidas a técnicas de hibridación. (DNA, RNA, Proteínas).

3.5.4.1 Preparación de la muestra

a) *Muestras de DNA para Southern Blots*

El DNA se corta primero con enzimas de restricción y los fragmentos de DNA de doble cadena resultantes tienen una conformación que no necesita pre-tratamiento.

b) *Muestras de RNA para Northern Blots*

Aunque el RNA es de una sola cadena, algunas moléculas tienen pequeñas regiones que pueden formar estructuras secundarias basadas en el apareamiento de las bases. Para evitar esto el RNA es pre-tratado con formaldehído.

c) *Muestras de Proteínas para Western Blots.*

Las proteínas tienen estructuras secundarias y terciarias y no siempre poseen cargas negativas. Las proteínas se tratan con el detergente SDS (Dodecil sulfato de sodio) el cual remueve las estructuras secundarias y terciarias, además rodea a la proteína de una capa de cargas negativas ¹¹⁰.

Si las condiciones anteriores se satisfacen, las moléculas serán separadas en base a su peso molecular, en donde los pesos moleculares mayores estarán cerca de los pozos de aplicación de la muestra y los pesos moleculares más bajos se alejarán de éstos. La distancia migrada es proporcional al logaritmo del inverso del peso molecular ($\log 1/PM$). Los pesos moleculares se miden en diferentes unidades según la molécula deseada.

- * DNA.- El peso molecular se mide en pares de bases (**pb**) y comúnmente en kilopares de bases (1000 pb) o **kpb**.
- * RNA.- El peso molecular se mide en nucleótidos (**nt**) y comúnmente en kilonucleótidos (1000 nt) o **knt**. Algunas veces se utilizan bases (**b**) o kilobases (**kb**).
- * Proteínas.- El peso molecular se mide en Daltons (**gramos/mol**) o **D**, y comúnmente en kiloDaltons (1000 Da) o **kD**.

Una vez obtenido el gel se procede a la tinción, los colorantes y procedimientos varían según el tipo de molécula.

▶ *Tinción de DNA*

El DNA se tiñe con Bromuro de Etidio, el complejo DNA-BrEt fluoresce bajo la luz UV.

▶ *Tinción de RNA*

El RNA también se tiñe con Bromuro de Etidio y el complejo RNA-BrEt fluoresce con luz UV.

▶ *Tinción de Proteínas*

Las proteínas se tiñen con Azul de Coomasie (CB). El complejo proteína-CB es de un color azul oscuro y puede observarse con luz visible ¹¹⁰.

3.5.5 Transferencia a un Soporte Sólido

Después de que el DNA, RNA o proteína ha sido separado por peso molecular, debe ser transferido a un soporte sólido antes de la hibridación, esto se debe a que el proceso de hibridación no se puede efectuar sobre un gel. Este proceso de transferencia se denomina "blotting" y de ahí que el nombre de estas técnicas de hibridación sea "Blots". Generalmente este soporte sólido es una hoja de papel de nitrocelulosa (algunas veces se les llama filtro porque estas hojas de nitrocelulosa fueron utilizadas originalmente como papel filtro), aunque otro tipo de material puede ser utilizado. El DNA, RNA y las proteínas se adhieren de manera eficiente a la nitrocelulosa de manera independiente ¹¹⁰. El proceso de transferencia puede ser de dos maneras:

1) *Por Electroforesis*, en la cual se aprovecha la carga negativa de las moléculas (ver Fig. 132).



Fig. 132. Transferencia de bandas a papel de Nitrocelulosa por medio de Electroforesis.¹¹⁰

2) *Por Capilaridad*, donde las moléculas son transferidas en un flujo de buffer desde papel filtro mojado a papel filtro seco (ver Fig. 133).

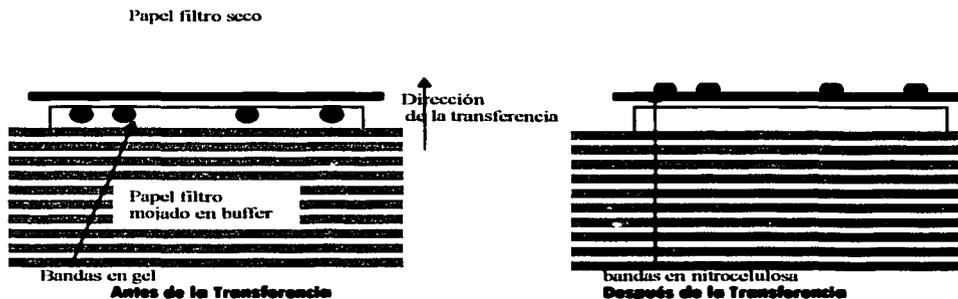


Fig. 133. Transferencia de bandas a papel de nitrocelulosa por Capilaridad.¹¹⁰

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Nota.- En un Southern Blot, las moléculas de DNA en el gel son de doble cadena, de modo que deben separarse para poder efectuar la hibridación. Para hacer esto, el DNA es transferido utilizando un buffer fuertemente alcalino, el cual ocasiona que las dos cadenas de DNA se separen. Este proceso es llamado desnaturalización y unión al papel de nitrocelulosa como moléculas de DNA de una sola cadena. Para los RNA y proteínas este tratamiento no es necesario.

3.5.6 Preparación de la Sonda

El objetivo es crear una copia radioactiva de un fragmento de DNA de doble cadena. El proceso empieza generalmente con un fragmento de restricción de un plásmido que contiene el gen de interés (En la sección 3.6 se describe con más detalle los vectores como plásmidos y otros). El plásmido es digerido con la enzima de restricción específica y el producto obtenido se corre en gel de agarosa. Ya que un plásmido es generalmente menor de 20 kpb de longitud, esto significa que se obtienen fragmentos de DNA de 2 a 10 pb. Si el mapa de restricción del plásmido es conocido, la banda deseada puede identificarse en el gel. Posteriormente la banda se corta del gel y se extrae el DNA ¹¹⁰.

Este fragmento de restricción (plantilla) se trata por el Método de Marcado Aleatorio de Hexámeros (ver Fig. 134).

- 1) La Plantilla de DNA se desnaturaliza, las cadenas se separan por ebullición.
- 2) Se añade una mezcla de Hexámeros de DNA (un hexámero es una cadena de DNA de seis nucleótidos), esta mezcla contiene todas las secuencias complementarias posibles a la plantilla. Se permite que el apareamiento ocurra y esto sucederá en muchos sitios a lo largo de cada cadena de DNA.
- 3) Se añade DNA polimerasa junto con dATP, dGTP, dTTP, y dCTP radioactivo. Generalmente el grupo fosfato que está unido al azúcar es sintetizado a partir de Fósforo-32 (P³²), el cual es radioactivo. (Este grupo fosfato es el que es incorporado a la cadena de DNA).
- 4) La mezcla es hervida para separar las cadenas y entonces esta lista para hibridación.

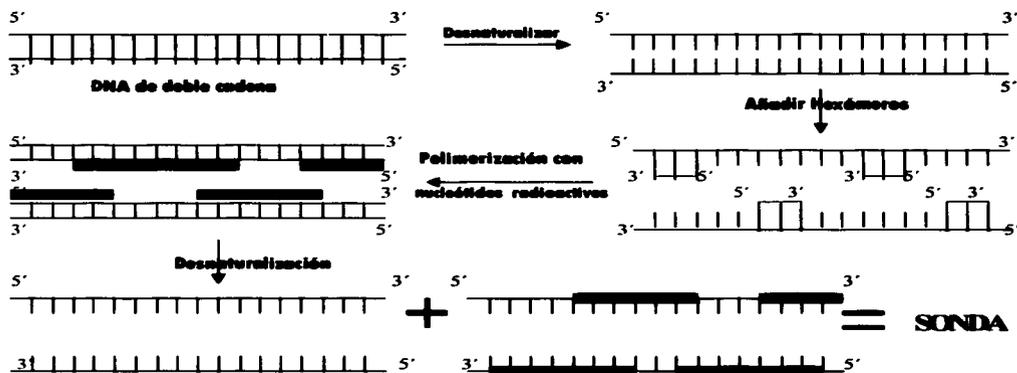


Fig. 134. Producción de una sonda de DNA marcada radioactivamente. ¹¹⁰

3.5.7 Hibridación

En las tres Blots, la sonda marcada se añade al papel de nitrocelulosa embebido en buffer y se incuba por varias horas para permitir que las moléculas de la sonda encuentren sus "blancos".

3.5.8 Lavado

Después de que los híbridos se han formado, es necesario remover cualquier sonda que no se haya unido de manera específica a su molécula "blanco". Debido a que el papel de nitrocelulosa es absorbente algunas de las sondas pueden quedar adheridas, si no se hace todo el papel será radioactivo y los híbridos específicos no pueden detectarse.

Para realizar esto el papel filtro se lava repetidamente en varios cambios de buffer para eliminar cualquier sonda que no haya formado híbridos.

NOTA.- En Southern y Northern, los híbridos pueden formarse entre moléculas con secuencias similares pero no necesariamente idénticas (por ejemplo, el mismo gen de dos especies diferentes). Esta propiedad puede ser utilizada para estudiar genes de diferentes organismos o genes que han mutado. Las condiciones de lavado pueden modificarse de tal manera que los híbridos con diferentes frecuencias de apareamiento se conserven. A este proceso se le llama "*Control de Severidad*", es decir, a mayor temperatura de lavado, éste es más rígido y menos variaciones en los apareamientos son permitidas ¹¹⁰.

3.5.9 Detección de los Híbridos

En este punto, se tiene una hoja de nitrocelulosa con manchas de una sonda unida a su molécula "blanco" en todos los lugares del papel en donde se pudieron formar híbridos. El papel luce como una hoja en blanco por lo que ahora se deben detectar esos lugares de unión de la sonda. Para ello se utiliza una técnica llamada Autoradiografía.

3.5.9.1 Autoradiografía

En la autoradiografía se aprovecha que las partículas emitidas por un átomo radioactivo pueden activar una emulsión fotográfica, de igual manera que la luz o los rayos X pueden activar la emulsión que recubre un pedazo de película. Cuando se pone en íntimo contacto la emulsión fotográfica con una fuente radioactiva, las partículas emitidas por la fuente aparecen en la emulsión como minúsculos gránulos negros plateados al revelar la fotografía ¹¹⁰.

Para la identificación de híbridos se presiona el papel de nitrocelulosa contra una placa de rayos X y se le deja en la oscuridad por un tiempo que varía desde unos minutos hasta unas cuantas semanas. La placa revelará en donde la sonda se unió a su molécula "blanco". Después de esto habrá manchas negras en el papel en aquellos lugares donde se localizan los híbridos ¹¹⁰.

La Tabla 11 resume los procedimientos empleados en esta sección

TABLA 15. Protocolo de las Técnicas de Hibridación Molecular.¹¹⁰

	Southern Blot	Northern Blot	Western Blot
1	Extraer el DNA de las células	Extraer el RNA de las células	Extraer Proteínas de las células
2	Cortar con enzimas de restricción	Desnaturalizar con formaldehido	Desnaturalizar con SDS
3	Electroforesis en gel (generalmente agarosa)	Electroforesis en gel (generalmente agarosa)	Electroforesis en gel (generalmente poliacrilamida-SDSPAGE)
4	Desnaturalizar DNA con álcali		
5	Transferir a Nitrocelulosa (generalmente por capilaridad)	Transferir a Nitrocelulosa (generalmente por capilaridad)	Transferir a Nitrocelulosa (generalmente por electroforesis)
6	Bloquear con DNA en exceso	bloquear con RNA en exceso	Bloquear con proteína en exceso
7	Hibridizar con sonda de DNA marcada.	Hibridizar con sonda de DNA marcada.	Hibridizar con sonda de anticuerpo marcado.
8	Lavar para eliminar sonda no unida.	Lavar para eliminar sonda no unida.	Lavar para eliminar sonda no unida.
9	Autoradiografía	Autoradiografía	Autoradiografía o revelado enzimático con sustrato cromogénico

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

3.6 CLONACIÓN

La Clonación de DNA es una técnica fundamental para producir grandes cantidades de un segmento de DNA específico. El segmento de DNA que debe clonarse primero se une a un DNA vector, que es un vehículo para transportar DNA extraño a una célula huésped adecuada. El vector contiene secuencias que le permiten duplicarse dentro de la célula huésped ¹⁰³.

3.6.1 Características de un Vector de Clonación

a) Propiedades requeridas

- Un origen de replicación
- Sitios específicos/únicos en donde el DNA extraño pueda ser introducido.

b) Propiedades deseables

- Alto número de copias
- Marcador selectivo (resistente a antibióticos)
- Marcador detectable para recombinantes ¹⁰⁴.

3.6.2 Tipos de Vectores

A continuación se enlistan los diferentes vectores que pueden utilizarse para clonación de DNA. Posteriormente se estudiarán las características de cada uno.

- Plásmidos
- Cósmidos
- Bácmidos
- Cromosoma de Levadura Artificial (YAC)
- Fago lambda

3.6.3 Plásmidos

Los plásmidos son pequeños círculos de DNA encontrados en células bacterianas, separados del cromosoma bacteriano y más pequeño que éste. Son capaces de pasar fácilmente de una célula a otra, aún cuando estas células son de diferentes especies, y muy alejadas en la escala evolutiva ¹⁰⁵.

Para formar una molécula de DNA recombinante utilizando un plásmido pueden utilizarse diferentes métodos.

1. Uno de los enfoques más sencillos y populares consiste en cortar el plásmido y el DNA donante con la misma enzima de restricción, de forma que se generen extremos cohesivos idénticos. Una vez que el fragmento se ha asociado con el plásmido por apareamiento de bases, la DNA ligasa se encarga de unir los cortes ¹⁰². (Ver Fig. 135.)

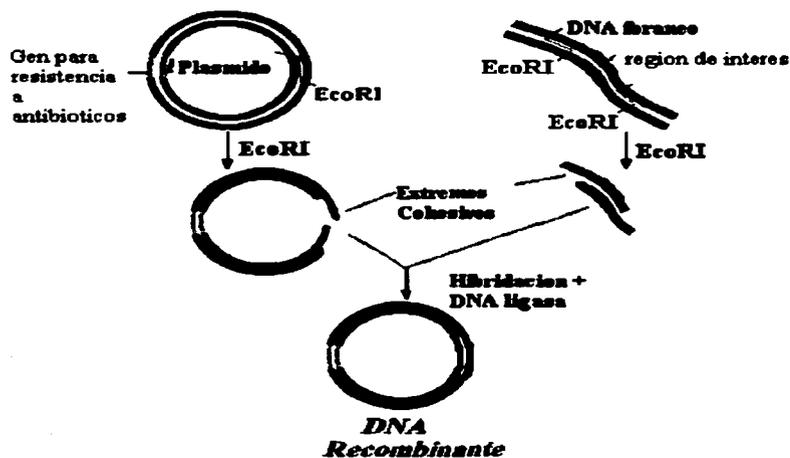


Fig. 135. Construcción de un plásmido recombinante.¹⁰²

2. Un segundo método para crear moléculas recombinantes puede emplearse con fragmentos y vectores que carecen de extremos cohesivos. Después de cortar el plásmido y el DNA donador, se puede añadir poli (dA) a los extremos 3' del plásmido, utilizando la enzima transferasa terminal. De igual forma, se añade poli (dT) a los extremos 3' de los fragmentos. Ahora los extremos pueden aparearse entre sí y son unidos a continuación por la DNA ligasa para formar un plásmido recombinante¹⁰². Ver Fig. 136.

3. Algunas enzimas (por ejemplo, la enzima de restricción AluI de *Arthrobacter luteus*) corta el DNA en la misma posición en ambas cadenas y origina un extremo romo. Los fragmentos de DNA y los vectores con extremos romos pueden unirse mediante la acción de DNA ligasa T4 (ligación de extremos romos)¹⁰². La DNA ligasa T4 genera enlaces fosfodiéster entre extremos 5' fosfato y 3' hidroxilo; uno extremos cohesivos o escindidos¹⁰⁴.

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

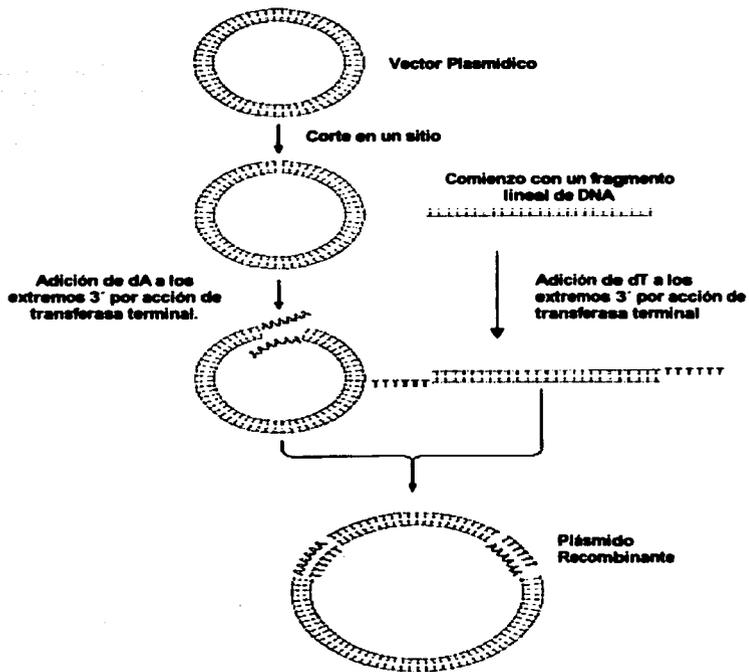


Fig. 136. Construcción de un plásmido recombinante utilizando transferasa terminal.¹⁰²

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

3.6.3.1 Algunas consideraciones importantes al trabajar con plásmidos.

a) *Concentración de extremos de DNA*

- ✗ 25ng para 100 ng de cada componente de DNA en una reacción de 20 μ l.
- ✗ La eficiencia de clonación aumenta utilizando altas concentraciones de los componentes ¹⁰⁴.

b) *El radio Molar de inserción para el vector debe ser 3:1*

- ✗ Si se desea favorecer eventos intermoleculares, unir dos moléculas diferentes sobre eventos intramoleculares o la unión de las mismas moléculas.
- ✗ Si se añade demasiado inserto (fragmentos de DNA), estos pueden formar concatémeros, esto es, los fragmentos se unirán entre sí y no podrán ser unidos al vector.
- ✗ Demasiado vector promueve la ligación intramolecular o la ligación de la molécula del vector a sí misma. La autoligación de las moléculas del vector producirá transformaciones indeseables. A esto se le llama “fondo” ¹⁰⁴.

c) *Cantidad de ligasa utilizada por reacción*

- ✗ Extremos cohesivos.- de 0.1 a 1.0 unidades
- ✗ Extremos romos.- de 1.0 a 2.0 unidades.

d) *Temperatura de reacción*

- ✗ La ligación es completa al 90% a 26° C por 4 horas
- ✗ La ligación es completa al 10%, a 4° C por 4 horas y es completa al 80% a 4° C después de 15 horas.

3.6.3.2 Estrategias de clonación para reducir el efecto de “fondo” ocasionado por la autoligación del vector.

1. *Subclonación no direccional de un fragmento de DNA (Fig 137.)*

- a) Tanto el vector como el inserto (fragmento de DNA) han sido digeridos con la misma enzima, generando extremos cohesivos y homólogos.
- b) El inserto puede ser unido en cualquier orientación ¹⁰⁴.

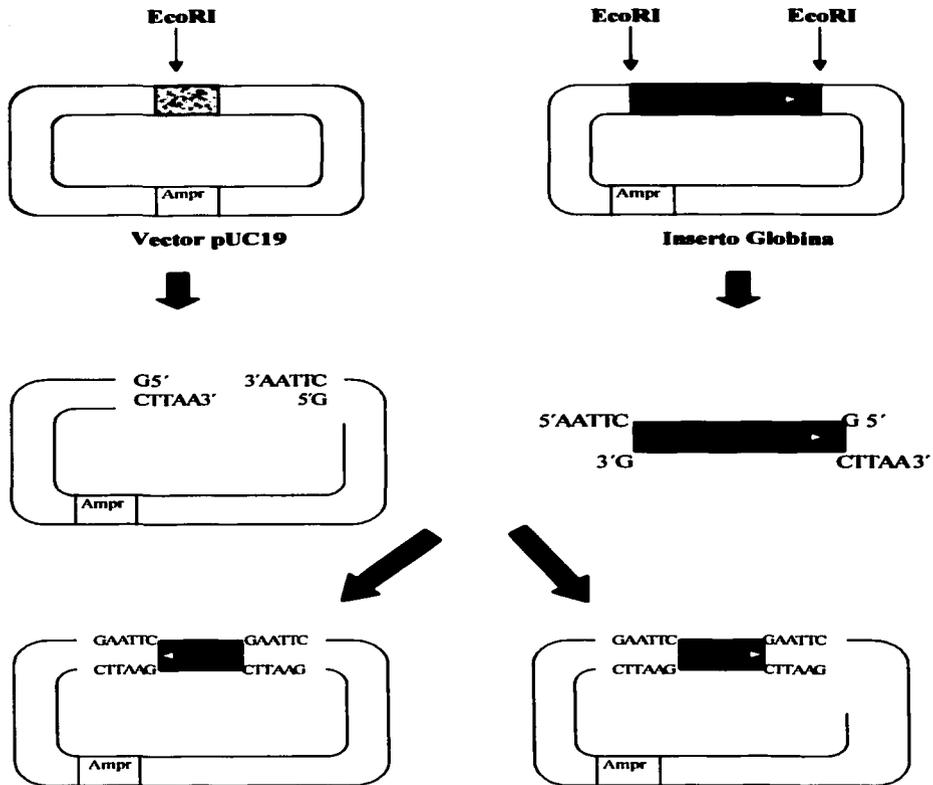


Fig. 137. Clonación no Direccional. El fragmento globina puede ser insertado en el vector pCU19 en cualquier dirección.¹⁶⁴

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2. *La clonación direccional por digestión del vector e inserto con dos diferentes endonucleasas de restricción para generar extremos heterólogos.* (Fig. 138)

- Es el método preferido de clonación.
- El inserto es orientado en una dirección definida.
- Es menos probable que se obtenga auto-ligación del vector, lo cual disminuye el efecto de "fondo".
- Las moléculas del vector que son digeridas únicamente con una enzima pueden auto-ligarse y generar efecto de fondo.
- Si los sitios de la enzima están juntos puede ser difícil insertar todas las moléculas con ambas enzimas ¹⁰⁴.

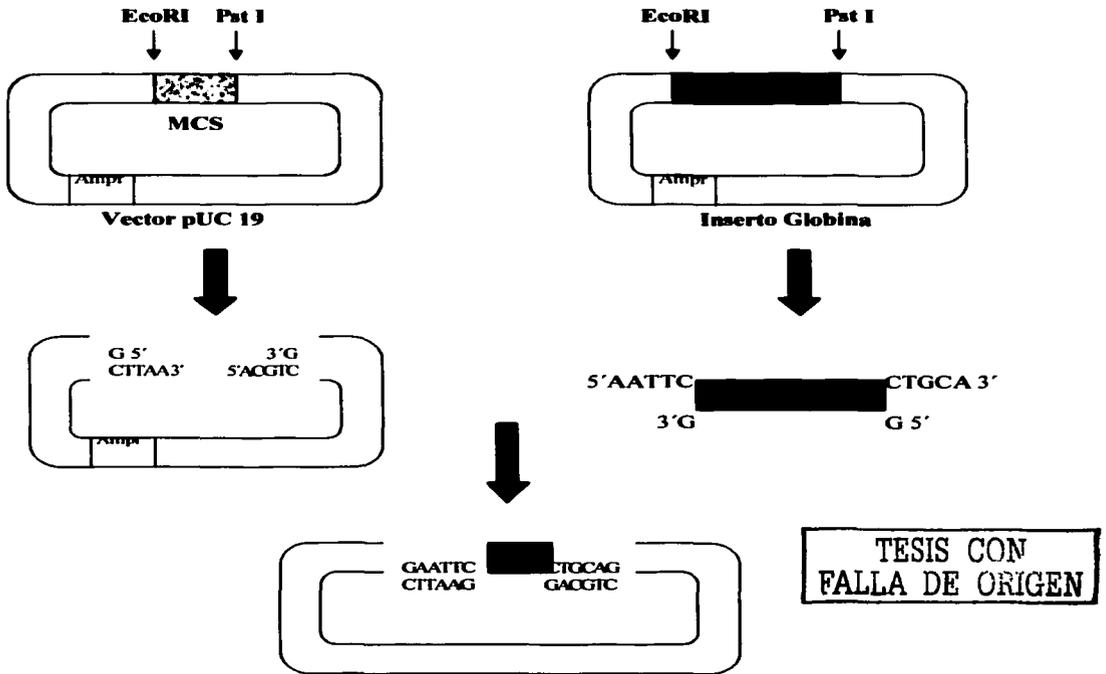
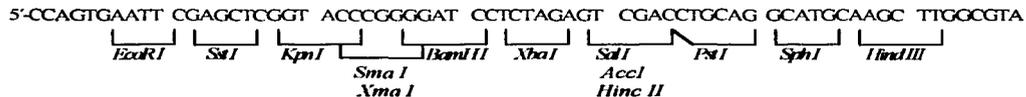


Fig. 138. Clonación Direccional. Inserto globina ligado en el vector pUC 19.¹⁰⁴

3. *Eficiencia de la doble digestión:*

- a) Se ha observado que algunos plásmidos tienen sitios de clonación múltiples, por ejemplo, el plásmido pUC19 posee múltiples sitios de inserción como se muestra a continuación ¹¹²:



Como puede apreciarse, es necesario efectuar varias digestiones con enzimas de restricción, el orden en el cual se llevan a cabo puede afectar la finalización de la reacción de inserción. A continuación se muestra en la Tabla 14 un listado de la eficiencia de inserción de pares seleccionados de endonucleasas de restricción, utilizadas en reacciones consecutivas.

- b) Añadir controles para verificar la eficiencia de cada digestión individualmente.

TABLA 14. Eficiencia de Inserción en Digestiones Dobles.¹⁰⁴

Primera Enzima	Segunda Enzima	Eficiencia de Digestión*
<i>EcoR I</i>	<i>Sst I</i>	+
	<i>Kpn I</i>	+
	<i>Sma I</i>	+
	<i>BamH I</i>	+
	<i>Xba I</i>	+
<i>Sma I</i>	<i>Sst I</i>	+
	<i>Kpn I</i>	-
	<i>BamH I</i>	+
	<i>Xba I</i>	+
<i>BamH I</i>	<i>Kpn I</i>	+
	<i>Sma I</i>	+/-
	<i>Xba I</i>	+
	<i>Sal I</i>	+
	<i>Pst I</i>	+

Primera Enzima	Segunda Enzima	Eficiencia de Digestión*
<i>Pst I</i>	<i>BamH I</i>	+
	<i>Xba I</i>	+
	<i>Sal I</i>	-
	<i>Sph I</i>	+/-
	<i>Hind III</i>	+/-
<i>Hind III</i>	<i>Sph I</i>	+
	<i>Pst I</i>	+
	<i>Sal I</i>	+
	<i>Xba I</i>	+

+ digestión completa
 +/- digestión parcial
 - no digestión

3.6.3.3 Otras técnicas de Clonación para plásmidos y otros vectores

1. Digestión de un vector en un solo sitio seguido de la defosforilación utilizando fosfatasa intestinal de becerro. (Fig. 139)

- La DNA ligasa requiere un fosfato 5' para formar un enlace covalente.
- Las moléculas de DNA lineal se transforman de manera ineficiente.
- El DNA inserto será ligado al DNA vector debido a la presencia de 5' fosfato en el DNA inserto; serán generadas moléculas circulares con hendiduras.
- Después de la transformación, los DNAs circulares con hendiduras serán reparados por procesos enzimáticos celulares del huésped¹⁰⁴.

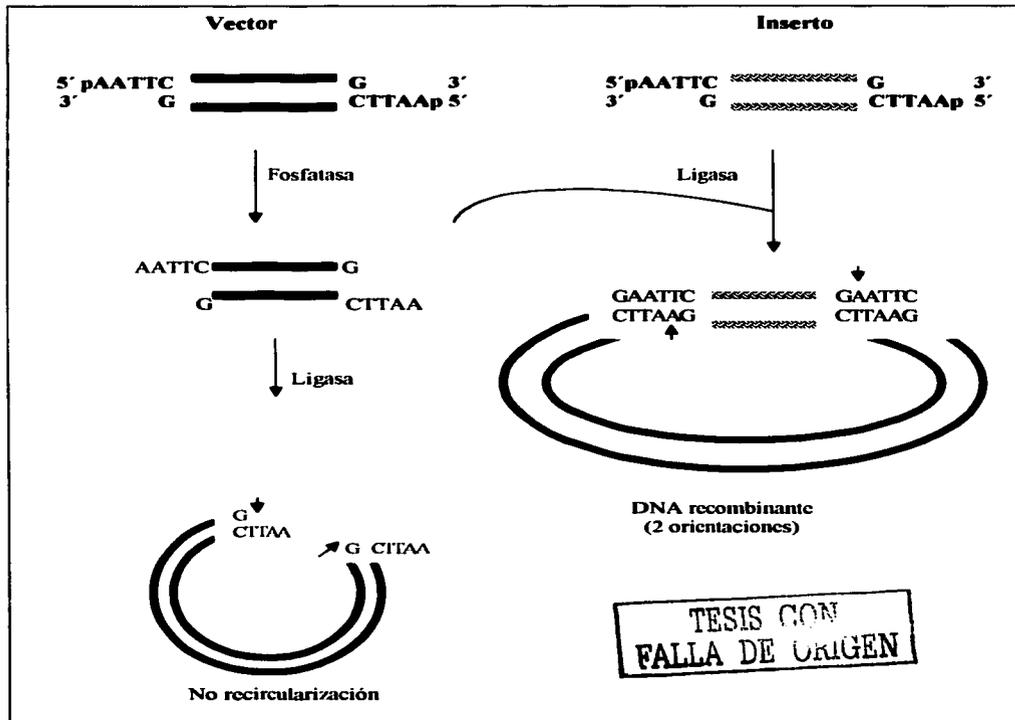


Fig. 139. Formación de DNA recombinante por defosforilación del vector en un solo sitio.¹⁰⁴

2. *Unión de fragmentos de DNA con extremos no compatibles.* (Fig. 140)

- a) Es necesario para convertir extremos incompatibles en extremos sin punta "romos".
- b) Fragmento Klenow + dNTPs llena el extremo 5' sobresaliente.
- c) La actividad exonucleasa 3' a 5' de DNA polimerasa T4 o Klenow es utilizada para remover nucleótidos salientes. (T4 tiene una mayor actividad de exonucleasa) ¹⁰⁴.

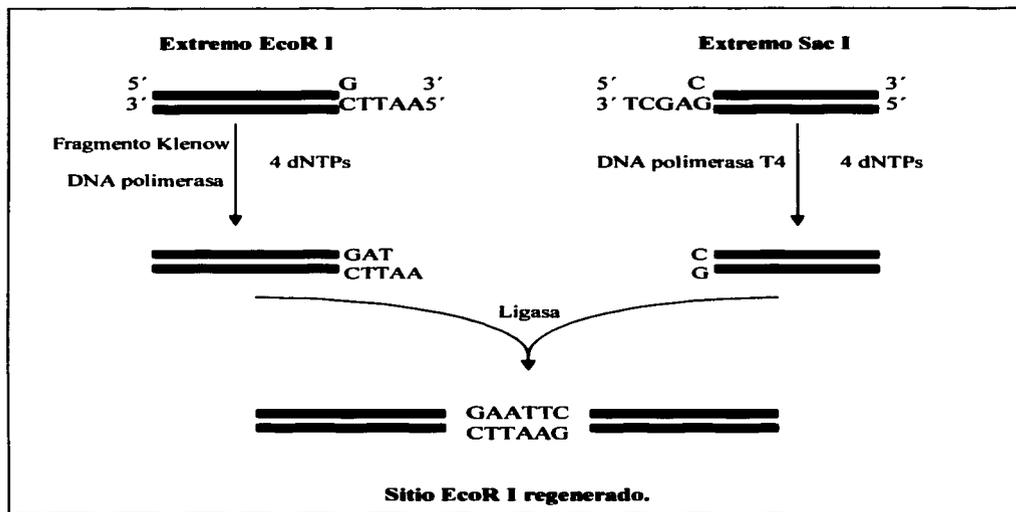


Fig. 140. Unión de fragmentos de DNA con extremos incompatibles.¹⁰⁴

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

3. Adición de conectores "linkers" para crear sitios de restricción en los extremos de los fragmentos de DNA. (Fig. 141)

- a) Linkers.- Oligodesoxiribonucleótidos de doble cadena que contienen sitios de endonucleasa de restricción; generalmente tiene de 8 – 10 nucleótidos de longitud.
- b) Los linkers generalmente tienen hidroxilos 5'- se fosforilan con polinucleótido cinasa T4 y ATP, se determina la eficiencia con un marcador de ATP [γ - P³²].
- c) Se mezclan con DNA de extremo escindido en un radio molar de 50:1 (linker / extremo DNA).
- d) Digerir el DNA ligado con la enzima apropiada para digerir a los linkers y evitar la digestión de sitios internos.- El DNA se metila antes de la adición del linker.
- e) Remover el linker en exceso de la solución de DNA para evitar que éste sea insertado en el vector de clonación ¹⁰⁴.

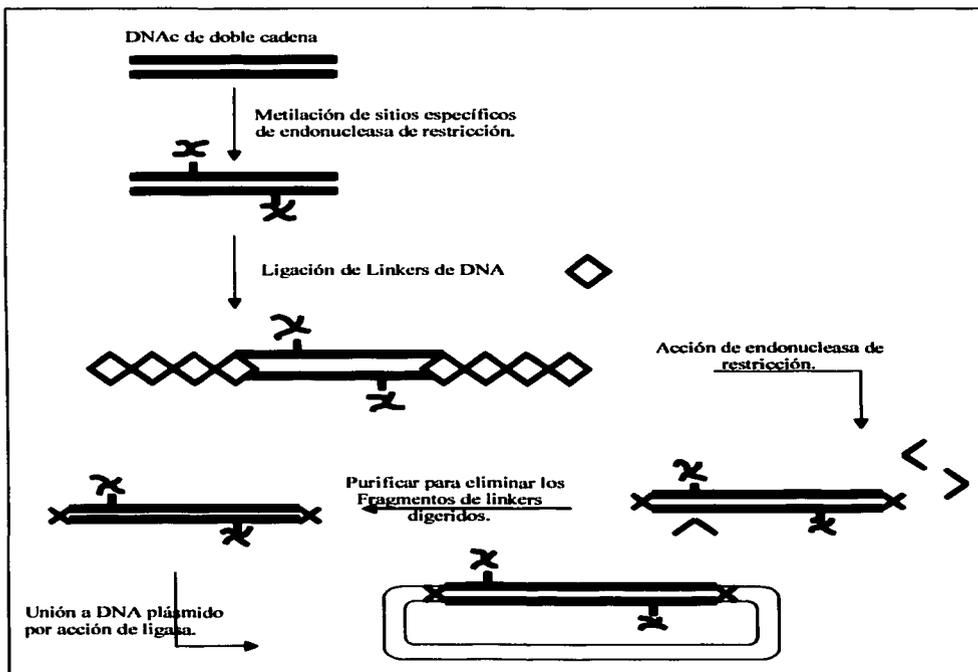


Fig. 141. Uso de "linkers" para la clonación de DNA. ¹⁰⁴

3. Adición de adaptadores para crear sitios de restricción en los extremos de los fragmentos de DNA. (Fig. 142)

- a) Adaptadores.- Oligodesoxiribonucleótidos de doble cadena que contienen sitios de endonucleasa de restricción; generalmente de 8-10 nucleótidos de restricción. Los extremos son asimétricos.
- b) Los adaptadores generalmente están fosforilados únicamente en un extremo.
- Fosforilar un oligonucleótido de una sólo hebra con polinucleótido cinasa T4 y ATP, determinar la eficiencia con un marcador de ATP [γ - P^{32}].
 - Mezclar con el otro nucleótido (no fosforilado); hibridizar.
- c) Ligar al DNA inserto.
- Los adaptadores de extremos escindidos pueden ser ligados a insertos con extremos escindidos en un radio molar de 50:1, respectivamente (Si el extremo escindido es fosforilado, otro extremo saliente no lo está).
 - Los adaptadores pueden ser ligados a insertos con salientes en un radio molar de 10:1 de extremo, respectivamente (el extremo compatible del adaptador es fosforilado, el otro extremo no está fosforilado).
- d) Remover el exceso de adaptador de la solución de DNA para evitar que éste sea insertado en el vector de clonación.
- e) Ligar el DNA inserto adaptado al DNA vector (alternativamente, uno pudo fosforilar el DNA inserto adaptado y después ligarlo) ¹⁰⁴.

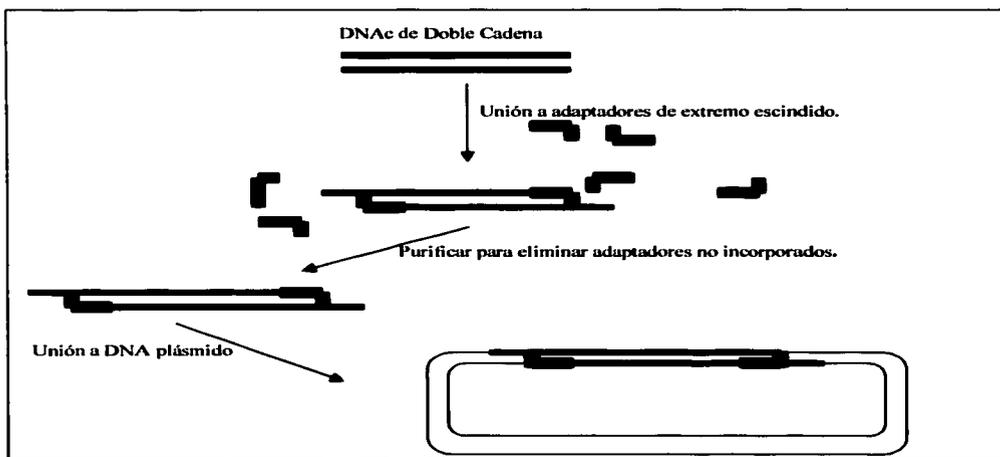


Fig. 142. Uso de Adaptadores para clonación de DNA. ¹⁰⁴

3.6.4 Vectores Fágicos

En la tecnología del DNA recombinante se han utilizado vectores de fagos monocatenarios y bicatenarios. Por ejemplo, los derivados del fago lambda son de gran utilidad en la donación y son capaces de transportar fragmentos de hasta unas 45 kb de longitud. Los genes que codifican la lisogenia y la integración a menudo no son funcionales y pueden sufrir una delección para dejar sitio al DNA foráneo. El genoma del fago modificado también contiene secuencias de restricción en áreas que no alterarán la replicación. Tras la inserción del DNA foráneo en el cromosoma del vector lambda modificado, el genoma mágico recombinante se introduce (se dice que se empaqueta) en cápsides virales y puede utilizarse para infectar células huésped de *E.coli*. Estos vectores se utilizan a menudo para generar genotecas. Véase Fig. 143. También puede transformarse *E.coli* directamente de DNA de fago lambda recombinante y producir fagos. Sin embargo, este enfoque es menos eficaz que el uso de partículas mágicas completas. Este proceso se denomina "transfección".¹⁰²

3.6.5 Cósmidos

Los cósmidos son plásmidos que contienen sitios *cos* (extremos cohesivos del DNA del fago λ) y que pueden empaquetarse en cápsides fágicas. El genoma del fago lambda se replica como una larga hebra poligenómica conteniendo regiones *cos* a intervalos constantes. Cuando el genoma va a ser empaquetado en una cápside, es escindido en un sitio *cos* y el DNA lineal se inserta en la cápside hasta que haya entrado un segundo sitio *cos*. Se produce así el empaquetamiento de todo el DNA comprendido entre dos sitios *cos*, independientemente que sea DNA fágico o foráneo siempre y cuando no sobrepase un tamaño determinado. Es posible transportar la elevada cantidad de 50 kb de DNA.

Los cósmidos contienen típicamente varios sitios de restricción y genes de resistencia a antibióticos. Se empaquetan en cápsides del fago λ para su inyección eficiente en las bacterias, pero también pueden existir en forma de plásmidos en el interior del huésped bacteriano.¹⁰²

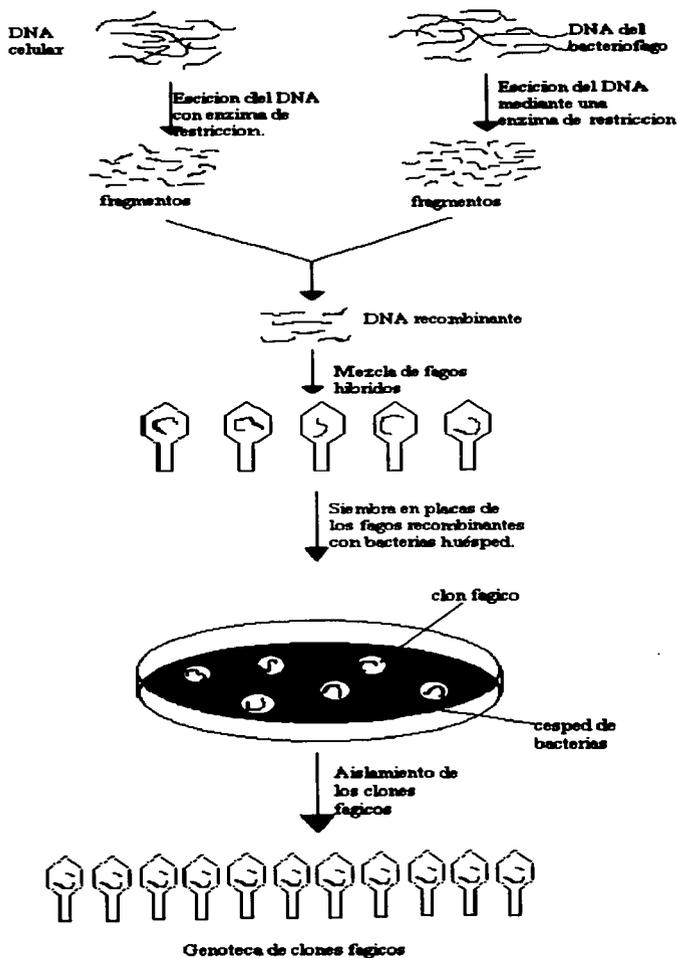
3.6.6 Cromosomas Artificiales

Los cromosomas artificiales son populares porque transportan grandes cantidades de material genético y existen dos que se utilizan de manera más común: El Cromosoma Artificial de Levadura (YAC, del inglés *yeast artificial chromosome*) y el Cromosoma Artificial Bacteriano (BAC, del inglés *bacterial artificial chromosome*)

3.6.6.1 El Cromosoma Artificial de Levadura (YAC)

A YAC se le considera un cromosoma funcional porque posee tres secuencias específicas de DNA que le permiten propagarse desde una célula a su progenie (Fig. 144), estas secuencias son las siguientes:

- **TEL:** El telómero, que se localiza en cada extremo del cromosoma y protege al DNA lineal de la degradación por acción de nucleasas.
- **CEN:** El centrómero, que es necesario para segregar las cromátides en las células hijas.
- **ORI:** Las secuencias de origen de replicación, que son secuencias de DNA específicas que permiten que la maquinaria de replicación se ensamble en el DNA y se mueva en la horquilla de replicación¹¹³.



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Fig. 143. Uso del Fago lambda como vector.¹¹⁰

También contiene otras secuencias específicas como:

- * **A y B:** Marcadores selectivos, que permiten el fácil aislamiento de las células de levadura que contienen al cromosoma artificial.
- * **Sitio de Reconocimiento,** para dos enzimas de restricción: EcoRI y BamHI

Mientras que la clonación de DNA en un plásmido permite la inserción de un fragmento de aproximadamente 10,000 pb, la clonación de DNA en un YAC permite la inserción de fragmentos de DNA de hasta 1, 000,000 pb ¹¹³.

¿Porqué es importante ser capaz de clonar secuencias tan grandes?

- * Para construir el mapa completo del genoma humano (3 x 1, 000, 000, 000 pb) se requeriría de más de 100, 000 clones en plásmidos. De ahí que, utilizando clones en YAC, necesitamos aproximadamente 10, 000 para representar el genoma completo.

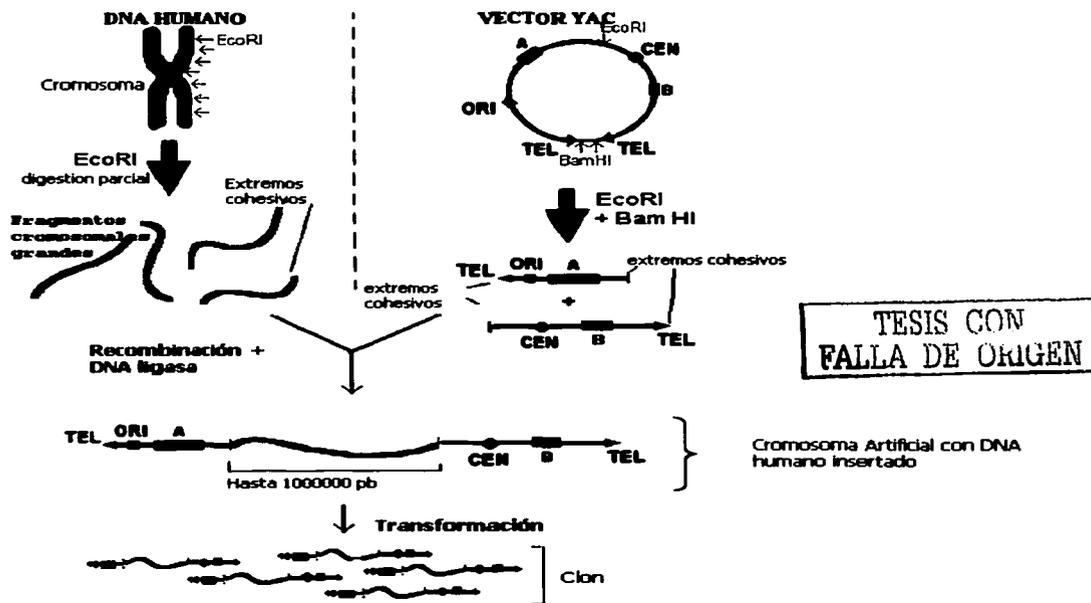


Fig. 144. Clonación de DNA dentro de un Cromosoma Artificial de Levadura (YAC).²⁰⁰

3.6.6.2 El Cromosoma Artificial Bacteriano (BAC)

El BAC es un vector de donación alternativo que está adquiriendo cada vez más popularidad. Los BAC son vectores basados en el plásmido de fertilidad de *E.coli*, denominado el factor F. contienen sitios de enzimas de restricción adecuadas y un marcador como un gen de resistencia al cloramfenicol. El plásmido modificado es escindido en un sitio de restricción y se inserta un fragmento de DNA foráneo de hasta 300 kb de longitud mediante la DNA ligasa. El BAC se reproduce en *E.coli* tras su inserción en la célula mediante electroporación. Este vector es fácil de reproducir y manipular y no sufre recombinación con la misma facilidad que los YAC.¹⁰²

3.6.7 Las Genotecas (Bibliotecas Genómicas)

Una vez obtenida la molécula de DNA recombinante esta se “dona” es decir, se inserta en bacterias utilizando el proceso de transformación o bien la transducción. Cada cepa se reproduce para generar una población que contiene un único tipo de molécula recombinante. Para confirmar que el genoma de un organismo está completo, deben mantenerse más de mil cepas bacterianas transformadas, cuanto mayor es el genoma, mayor número de cepas se almacena. Hecho esto se puede identificar el clon deseado. Si el gen se expresa en la bacteria puede ser posible analizar cada clon para aislar una proteína específica. Sin embargo, suele emplearse una sonda de ácido nucleico. Se hace una réplica de las colonias bacterianas sobre papel de nitrocelulosa y se las lisa con hidróxido de sodio. Esto genera un patrón de DNA desnaturalizado fijado a la membrana que corresponde con el patrón original de las colonias sobre la placa de agar. A continuación se trata la membrana con una sonda radiactiva, como el método de transferencia de Southern individual. Las manchas radiactivas identifican las colonias de la placa maestra que contiene el fragmento de DNA deseado. Este enfoque también se utiliza para analizar genotecas del fago λ .¹⁰² El proceso se esquematiza en la Fig. 145.

La bacteria comúnmente utilizada para el desarrollo de moléculas recombinantes es *E.coli*. Existen muchas cepas que difieren en los genes que poseen, lo cual favorecerá el desarrollo de los recombinantes. En la Tabla 15 se muestran las características de algunas cepas de *E.coli* utilizadas con frecuencia en este tipo de tecnología. Posteriormente en la Tabla 16 se enlistan algunos de los marcadores genéticos más significativos en cepas de *E.coli* (un marcador genético es un gen o algún elemento cuya presencia o ausencia regulará cierta función en el desarrollo de la bacteria, lo que es importante para controlar el desarrollo de las moléculas recombinantes insertadas).¹⁰⁴

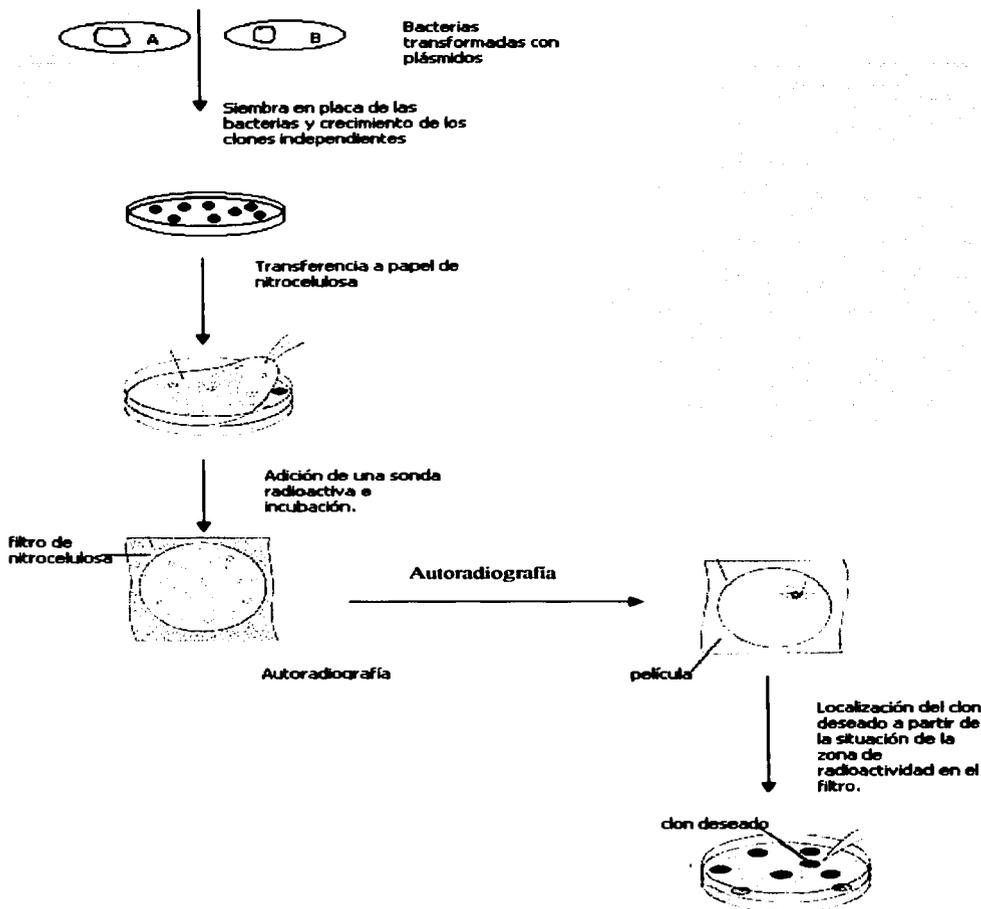


Fig. 145. Detección de un clon deseado a partir de una cepa de bacterias transformantes.¹¹⁰

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TABLA 15. Genotipos de Cepas de *E.coli* comúnmente utilizadas.^{10*}

Cepa	Genotipo	Comentarios	Referencias
C600	F-thi-1 thr-1 leuB6 lacY1 tonA21 supE44λ'	<ul style="list-style-type: none"> • Huésped para propósitos generales. 	1. Appleyard, R.K. (1954) Genetics 39, 440.
C600: hñA 150 (Y1073)	F- thi-1 thr-1 leuB6 lacY1 tonA21 SupE44λ' hñA150 (chr::Tn10)	<ul style="list-style-type: none"> • Huésped para placas de fondo represivo de λgt10 cuando se establecen bibliotecas de DNAc. 	1. Young R.A and Davis, R. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 1194.
DF1	F-mcrBmrrhdsS(r _B 'm _B ')leuB6 ara14proA2lacY1 galK2xyI-5mtl-1 rpsL20(Sm')supE44tnp A' Cm'λ'γδ'	<ul style="list-style-type: none"> • Útil para clones pDELTA2 • Útil para generar deleciones en largos fragmentos de DNA. 	1. Wang, G, et al. (1993) Focus 15,47.
DH5	F- endA1 recA1 hsdR17(r _K 'm _K ') deoR thi-1 supE44λ' gyrA96 relA1.	<ul style="list-style-type: none"> • Huésped para pBR322 u otros vectores no pUC. • Útil para clonación DNAc. 	1. Hanahan, D. (1985) in DNA clning: A practical Approach, Vol. 1, p. 109, IRL Press, McLean, Virginia
DH5α	F- φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169 endA1 recA1 hsdR17(r _K 'm _K ') deoR thi-1 supE44λ' gyrA96 relA1.	<ul style="list-style-type: none"> • Huésped para pUC y otros vectores de complementación α; • pBR322. • Útil para clonación DNAc. 	1. Focus (1986) 8:2,9.
DH5αF'	F' φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169 endA1 recA1 hsdR17(r _K 'm _K ') deoR thi-1 supE44λ' gyrA96 relA1.	<ul style="list-style-type: none"> • Huésped para crecimiento de fágémidos M13, u otros bacteriófagos macho-específicos. • Proporciona complementación α para vectores M13mp. 	1. Liss, L.R. (1987) Focus 9:3,13.
DH5αF'IQ	F' proAB+ lac ZΔM15 zff::Tn5[Km'] relA1. φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169 endA1 recA1 hsdR17(r _K 'm _K ') deoR thi-1 supE44λ' gyrA96	<ul style="list-style-type: none"> • Huésped para expresión desde el promotor lac. • Huésped para crecimiento de fágémidos M13, u otros bacteriófagos macho-específicos. • Proporciona complementación α para vectores M13mp. 	1. Jesé, J., and Blodgett, K. (1988) Focus 10, 69.
DH5α-MCR	F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169 endA1 recA1 hsdR17(r _K 'm _K ') deoR thi-1 supE44λ' gyrA96	<ul style="list-style-type: none"> • Huésped para pUC y otros vectores de complementación α; • pBR322. • Útil para generar bibliotecas genómicas que contengan residuos metilados de citosina o adenina. 	1. Jesé, J., and Blodgett, K. (1988) Focus 10, 69.
DH10B	F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80dlacZΔM15 ΔlacX74 endA1 recA1 deoR Δ(ara, leu) 7697 araD139 galU galK nupG rpsL.	<ul style="list-style-type: none"> • Huésped para pUC y otros vectores de complementación α; • pBR322. • Útil para generar bibliotecas genómicas que contengan residuos metilados de citosina o adenina. • Útil para procedimientos de rescate de plásmidos. 	1. Lorrow, D. And Jesé, J. (1990) Focus 10, 69.

DH10B (ZIP)	F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80dlacZΔM15 ΔlacX74 endA1 recA1 deoR Δ(ara, leu) 7697 araD139 galU galK nupG rpsL λxis6 ind ^r pZIP1 (P1 ori-kan ^r cre).	<ul style="list-style-type: none"> • Huésped para vectores λZIPLOX con objeto de recuperar fagémidos de doble cadena recombinantes. 	1. D'Alessio, J.M., Bebec, R., Hartley, J.L., Noon, M.C., and Polayes, D. (1992) Focus 14, 76.
DH10B/p3	F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80dlacZΔM15 ΔlacX74 endA1 recA1 deoR Δ(ara, leu) 7697 araD139 galU galK nupG rpsL (p3: Km ^r amber Ap ^r amber tet ^r).	<ul style="list-style-type: none"> • Huésped para vectores que contengan un supresor RNAt tirosina o un gen sintético SupF. • Útil para generar bibliotecas genómicas que contengan residuos metilados de citosina o adenina. 	1. Lorrow-Murray, D. and Jessee, J. (1992) Focus 14, 71.
DH11S	mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Δ(lac-proAB) Δ(recA1398) deoR rpsL srl ^r thi ^r / F ^r proAB+lac I ^r ZΔM15.	<ul style="list-style-type: none"> • Útil para fagémidos y vectores M13. • Útil para generar bibliotecas genómicas que contengan residuos metilados de citosina o adenina. 	1. Lin, J.J., Smith, M., Jessee, J., and Bloom, F. (1991) Focus 13, 96. 1. Lin, J.J., Smith, M., Jessee, J., and Bloom, F. (1992) Biotechniques 12, 718.
DH12S	mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80dlacZΔM15 ΔlacX74 endA1 recA1 deoR Δ(ara, leu) 7697 araD139 galU galK nupG rpsL / F ^r proAB+lac I ^r ZΔM15.	<ul style="list-style-type: none"> • Útil para fagémidos y vectores M13. • Útil para generar bibliotecas genómicas que contengan residuos metilados de citosina o adenina. 	1. Lin, J.J., Smith, M., Jessee, J., and Bloom, F. (1991) Focus 14, 98.
DH12S (ZIP)	mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80dlacZΔM15 ΔlacX74 endA1 recA1 deoR Δ(ara, leu) 7697 araD139 galU galK nupG rpsL / F ^r proAB+lac I ^r ZΔM15 λxis6 ind ^r pZIP1 (P1 ori-kan ^r cre).	<ul style="list-style-type: none"> • Huésped para vectores λZIPLOX con objeto de recuperar fagémidos de doble cadena recombinantes. 	1. D'Alessio, J.M., Bebec, R., Hartley, J.L., Noon, M.C., and Polayes, D. (1992) Focus 14, 76.
DMI	F- dam ^r 13::Tn9(Cm ^r) dcm ^r mcrB hsdR ^r M ^r gal1 gal2 ara ^r lac ^r thr ^r leu ^r ton ^r tsx ^r Su ^r .	<ul style="list-style-type: none"> • Huésped para pBR322 u otros vectores no pUC. • Útil para generar pl^rsmidos que puedan ser reconocidos por endonucleasas de restricción sensibles dam y dcm. 	1. Lorrow-Murray, D. and Jessee, J. (1992) Focus 13, 20.
HB101	F-mcrB mrr hsdS20(r _B m _B ^r) recA13 leuB6 ara14 proA2 lacY1 galK2 xyl-5 mt11 rpsL20(Sm ^r) supE44 λ ^r .	<ul style="list-style-type: none"> • Híbrido de E.Coli K12 x E.coli B. • Huésped para pBR322 y muchos plásmidos. 	1. Boyer, H.W. and Roulland-Dussoix, D. (1969) J. Mol. Biol., 41, 459. 2. Lorrow-Murray, D. and Jessee, J. (1992) Focus 13, 20.
RR1	F-mcrB mrr hsdS20(r _B m _B ^r) leuB6 ara14 proA2 lacY1 galK2 xyl-5 mt11 rpsL20(Sm ^r) supE44 λ ^r .	<ul style="list-style-type: none"> • Versión recA⁺ de HB101 	1. Bolivar, F. Et al. (1977) Gene 2, 95. 2. Peacock, S.L. et al. (1981) Biochem. Biophys. Acta 655.243.
JM83	F- φ80dlacZΔM15 Δ(lac-proAB) ara rpsL.	<ul style="list-style-type: none"> • Huésped para plásmidos pUC; pBR322. • rec A^r r_k⁺ m_k⁺ 	1. Vieira, J. and Messing, J. (1982) Gene 19, 259. 2. Yanish-Perron, C., Vieira, J., and Messing, J.(1985) Gene 33, 103.
JM101	Δ(lac-proAB) supE thi / F ^r lac I ^r ZΔM15 traD36 proAB ⁺ .	<ul style="list-style-type: none"> • Huésped para vectores M13mp₈. • rec A^r r_k⁺ m_k⁺ 	1. Messing, J. et al. (1981) Nucleic Acids Res. 9.309.

JM107	$\Delta(\text{lac-proAB})$ thi gyrA96 endA1 hsdR17($r_k^- m_k^+$) relA1 supE44 λ^- / F' lac I'Z Δ M15 traD36 proAB+.	<ul style="list-style-type: none"> • Huésped para vectores M13mp. • rec A' $r_k^- m_k^+$ 	I. Yanish-Perron, C., Vieira, J., and Messing, J.(1985) Gene 33, 103.
LE392	F- hsdR514 ($r_k^- m_k^+$) supE44 supF58 lacY1 ó $\Delta(\text{lacIZY})6$ galK2 galT22 metB1 trpR55 λ^- .	<ul style="list-style-type: none"> • Derivado de la cepa ED8654 • Cepa supresora para propagación de vectores λ tales como λgtWES - λB. 	I. Murria, N.E, et al. (1977) Mol. Gen. Genet. 150, 53.
STBL2	mcrA (mcrBC-hsdRMS-mrr) endA1 recA1 thi gyrA96 relA1 supE44 (lac-proAB) λ^- .	• Huésped útil para estabilizar secuencias no estables tales como secuencias retrovirales y repeticiones directas.	I. Trinh, T., Jesé, J., Bloom, F.R., and Hirsch, V. (1994) Focus 16, 78.
TBI	F- ara $\Delta(\text{lac-proAB})$ rpsL. ϕ 80dlacZ Δ M15 hsdR17 ($r_k^- m_k^+$).	<ul style="list-style-type: none"> • Huésped para plásmidos pUC; pBR322. • $r_k^- m_k^+$ 	I. Focus (1984) 6:4,7
Y1088	supE supF metB trpR hsdR' hsdM' tonA21 strA Δ lacU169 (proC::Tn5) (pMC9).	• Huésped para amplificación de bibliotecas λ gt11.	I. Young, R.A. and Davis, R. (1983) Science 222, 778.
Y1089	Δ lacU169 proA' Δ lon araD139 strA hflA 15 $^\circ$ (Chr::Tn10) (pMC9).	• Huésped para la exploración anticuerpo/expresión de lisógenos λ gt11.	I. Young, R.A. and Davis, R. (1983) Science 222, 778.
Y1090	Δ lacU169 proA' Δ lon araD139 strA supF (trpC22::Tn10) (pMC9).	• Huésped para la búsqueda de anticuerpos de placas λ gt11	I. Young, R.A. and Davis, R. (1983) Science 222, 778.
Y1090(ZIP)	Δ lacU169 proA' hsdR' hsdM' Δ lon araD139 strA supF (trpC22::Tn10)	• Huésped para vectores λ ZIPLOX para formar placas.	I. D'Alessio, J.M., Bebee, R., Hartley, J.L., Noon, M.C., and Polayes, D. (1992) Focus 14, 76.

TABLA 16. Marcadores Genéticos significativos en Cepas de *E.Coli* comúnmente utilizadas.¹⁰⁴

Marcador	Descripción	Significancia
deoR	Gen regulador que permite la síntesis constitutiva de genes involucrados en la síntesis de desoxirribosa.	Permite el entendimiento de plásmidos largos.
end1	Mutación de endonucleasa.	La ausencia de endonucleasa mejora la calidad del DNA plásmido a partir de mini-preps.
F'	Episoma F', Huésped <i>E.coli</i> macho.	Necesario para la infección de M13.
hsdR17 (r _a ⁻ m _k ⁺)	Restricción negativa y modificación positiva.	Permite la clonación de DNA sin el proceso de reconocimiento por endonucleasas de restricción. El DNA preparado a partir del huésped con este marcados puede, de manera eficiente transformar huéspedes <i>E.coli</i> r _k ⁺ .
hsdS20 (r _a ⁻ m _k ⁻)	Restricción negativa y modificación negativa.	Permite la clonación de DNA sin el proceso de reconocimiento por endonucleasas de restricción. El DNA preparado a partir del huésped con este marcados es desmetilado por el sistema de modificación hsdS20.
gyrA	Mutación en DNA girasa.	Confiere resistencia al ácido nalidixico.
lacI ^q	Sobreproducción de la proteína represora lac.	El huésped que contiene este marcador sobreproduce el represor lac que regula la transcripción del promotor lac.
lacZΔM15	Delección parcial de lacZ que permite la complementación -α con β-galactosidasa del huésped.	Requerido para el uso con vectores pUC o M13. Da como resultado colonias azules y blancas ó placas para selección de clonas cuando se utiliza sobre X-gal.
Δlon	Delección de la proteasa lon	Reduce la degradación de proteínas de fusión de β-galactosidasa para aumentar la exploración de anticuerpos de bibliotecas λ.
mcrA	Restricción al eliminar la mutación de DNA metilado en la secuencia 5'-CmCGG-3'.	La ausencia del producto génico mcrA permite una clonación más eficiente de DNA que contiene 5-metilcitosina.
mcrB	Restricción al eliminar la mutación de DNA metilado en la secuencia 5'-CmC-3'	La ausencia del producto génico mcrB permite una clonación más eficiente de DNA que contiene 5-metilcitosina ó 5-hidroximetilcitosina.
mrr	Restricción al eliminar la mutación de DNA metilado en la secuencia 5'-CmAG-3' ó 5'-GmAC-3'	La ausencia del gen mrr permite una clonación más eficiente del DNA que contiene residuos metiladenina.
recA 1 / recA13	Deficiente recombinación.	Asegura la estabilidad de los insertos. El DNA transformado no se recombinará con el DNA del huésped. Los insertos son más estables in huéspedes recA1 que en huéspedes recA13.
relA	Mutación eliminando el factor estricto.	Regula un número de procesos biosintéticos celulares.
supE / sup F	Supresores ámbar.	Necesarios para desarrollar mutantes ámbar.
Tn5	Transposon	Codifica la resistencia al antibiótico kanamicina.
Tn10	Transposon	Codifica la resistencia al antibiótico Tetraciclina.
tonA	Mutación en proteínas de membrana externa.	Vence la resistencia celular al fago T1.
traD	Mutación eliminando un factor de transferencia.	Evita la transferencia del episoma F'.

NOTA: Otros marcadores genéticos que afectan los requerimientos de crecimiento en cepas de *E.coli* comúnmente utilizadas.

- leuB Requiere leucina
 - metB Requiere metionina
 - proA/B Requiere prolina
 - thi-1 Requiere tiamina

- galK/U No puede metabolizar galactosa
 - mtIA No puede metabolizar manitol
 - xy15 No puede metabolizar xilosa.
 - nupG Altera la comprensión del nucleósido.

3.6.8 Inserción de Genes en Células Eucariotas

No sólo es posible transformar una bacteria con un plásmido que contenga una secuencia foránea, también es posible el desarrollo de técnicas para insertar secuencias de DNA en células eucariotas. Algunas de estas técnicas también se han utilizado con éxito para transformar células bacterianas. El material genético inyectado directamente en células animales como huevos fertilizados en ocasiones se incorpora de forma estable al genoma del huésped para producir un animal transgénico, es decir, un animal dotado de nueva información genética derivada de la adquisición de DNA foráneo ¹⁰⁴.

3.6.8.1 Preparación de Células para Transformación

1. **Método CaCl_2** (Mandel and Higa, 1970)
 - a. Crecimiento de células a fase log temprana.
 - b. Enfriar a 4° C, colectar por centrifugación.
 - c. Resuspender en CaCl_2 50mM (se puede añadir buffer Tris o alguno que contenga otros iones (Kushner, 1978).
 - d. Las células competentes generalmente se preparan diariamente, y generan de 1×10^5 a 1×10^6 transformantes / μg de vector.
2. **Método Hanahan** (Hanahan, 1983).
 - a. Utilizar soluciones salinas complejas para lograr mayores eficiencias de transformación.
 - b. Las células pueden ser almacenadas a -70°C ; se pierde aproximadamente 1 log en eficiencia.
 - c. Las células frescas proporcionan de 1×10^7 a 1×10^8 transformantes / μg de vector.
3. **Células competentes congeladas LTI**
 - a. Preparadas por una modificación del método Hanahan.
 - b. Se proporciona como stock congelado – almacenar a -70°C .

3.6.8.2 Eficiencia de Transformación

A) Transformación con DNA plásmido.

- ▶ El DNA superenrollado funciona mejor (sin extremos libres – resistente a exonucleasas).
- ▶ El DNA circular transforma *E. Coli* 10^6 veces mejor que el DNA plásmido linealizado.

- ▶ Ya que la eficiencia de transformación no es crítica en la rutina de subclonación, este se convierte en un factor significativo cuando el DNA de clonación proviene de secuencias con poca abundancia de RNA¹⁰⁴.

B) Electroporación.

Método de alta eficiencia para la transformación de *E. coli* (se puede obtener 1×10^{10} transformantes / μg DNA plásmido superenrollado).

Esta técnica es muy eficaz y funciona en las células de mamíferos y en los cloroplastos de células vegetales. Se mezcla un conjunto de células con una preparación de DNA y a continuación se les expone brevemente a pulsos (aproximadamente 250 a 4000 V/cm para las células de mamífero), las células captan el DNA a través de los poros temporales creados en su membrana plasmática. Algunas de estas células sufrirán el proceso de transformación¹⁰².

Una de las técnicas más eficaces consiste en disparar microproyectiles revestidos con DNA al interior de células vegetales y animales. La pistola de genes, desarrollada inicialmente en la Universidad de Cornell (Nueva Cork) opera de forma similar a una pistola. Un cartucho vacío de calibre 22 dispara al interior de las células una salva de microproyectiles metálicos revestidos de DNA, como se muestra en la Fig. 146.

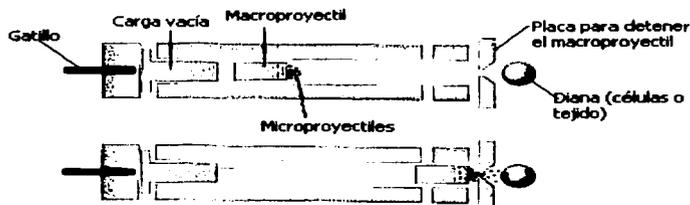


Fig. 146. Pistola de Genes.¹¹⁰

Este dispositivo se ha utilizado para transformar maíz y producir plantas de maíz fértil que contiene genes foráneos. Otras pistolas utilizan descargas eléctricas o gas a alta presión para propulsar los proyectiles revestidos de DNA. Estas pistolas en ocasiones reciben el nombre de dispositivos "biolísticos", un nombre derivado de los términos "biológico" y "balístico". Se han utilizado para transformar microorganismos (levaduras, el moho *Aspergillus* y el alga *Chlamydomonas*), células de mamífero y diversas células vegetales (maíz, algodón, tabaco, cebolla y chopo)¹⁰².

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CAPÍTULO 4

OTRAS TÉCNICAS UTILIZADAS EN INGENIERÍA GENÉTICA

4.1 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es un método común para crear copias de fragmentos específicos de DNA. PCR amplifica rápidamente una sola molécula de DNA en muchos billones de moléculas, sin necesidad de células bacterianas¹¹⁴. Se sabe que la polimerasa de DNA de especies de bacterias que viven en fuentes termales es estable a temperaturas de 90° C, muy por encima de la temperatura que destruye la actividad de otras polimerasas de DNA. El procedimiento básico se describe a continuación y se muestra en la Fig. 147.

Una muestra de DNA se mezcla con los cuatro desoxirribonucleótidos y una polimerasa de DNA resistente a temperatura, junto con los dos fragmentos de DNA sintéticos cortos (oligonucleótidos) complementarios de las secuencias de DNA en los extremos 3' de la región de DNA que se desea amplificar. Los oligonucleótidos sirven como iniciadores a los cuales se añaden los nucleótidos durante los pasos de duplicación descritos a continuación. La mezcla se calienta a 92 – 94° C, lo bastante caliente para separar las moléculas de DNA de la muestra en sus cadenas componentes. A continuación se enfría la mezcla para permitir que los iniciadores se enlacen a los extremos 3' de ambas cadenas del DNA específico y la polimerasa añada nucleótidos a los extremos 3' de los iniciadores. A medida que la polimerasa alarga los iniciadores, copiando selectivamente el DNA específico, forma nuevas cadenas de DNA complementarias. Elevando una vez más la temperatura, las cadenas de DNA originales y las recién formadas se separan. Enseguida se enfría la muestra para permitir que los iniciadores sintéticos en la mezcla se unan una vez más a los extremos 3' del DNA específico, que ahora está presente en cantidad doble de la original. Este ciclo se repite una y otra vez y en cada ocasión se duplica la cantidad de la región de DNA específica flanqueada por los iniciadores enlazados. En unas cuantas horas se pueden generar miles de millones de copias de esta región específica⁵⁸.

Además de emplearse para amplificar fragmentos de DNA específicos, la PCR puede generar grandes cantidades de DNA a partir de muestras mínimas. Por ejemplo, la técnica de PCR se puede usar en la investigación de crímenes para producir cantidades detectables de DNA a partir de una diminuta mancha de sangre seca encontrada en las ropas de un sospechoso o incluso a partir del DNA presente en alguna parte de un solo folículo piloso hallado en la escena del crimen^{58,114}.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

4.2 Cariotipificación Espectral

La cariotipificación espectral (SKY, por su nombre en inglés) es una técnica de laboratorio que permite a los científicos visualizar los 23 pares de cromosomas humanos al mismo tiempo, cada par de cromosomas está teñido en un color fluorescente diferente. Muchas enfermedades están asociadas con anomalías cromosomales. Por ejemplo, los cromosomas en células cancerosas exhiben con frecuencia aberraciones llamadas traslocaciones, en donde una pieza de un cromosoma se rompe y se une al extremo de otro. Identificar tales anomalías cromosomales y determinar su papel en la enfermedad es un avance importante en el desarrollo de nuevos métodos para diagnosticar desórdenes genéticos.

La cariotipificación tradicional permite a los científicos ver el juego de cromosomas completo en blanco y negro, esta técnica es útil para observar el número y el tamaño de los cromosomas. Sin embargo, no pueden identificarse muchas traslocaciones u otras anomalías utilizando únicamente un cariotipo en blanco y negro. Utilizando SKY se pueden ver fácilmente casos en donde un cromosoma, teñido de un color determinado, tenga unida una pequeña pieza de un cromosoma diferente, teñido de un color diferente (Ver Fig. 148).

La técnica de SKY involucra la preparación de una gran colección de secuencias cortas de DNA de cadena simple llamadas "sondas". Cada una de las sondas de esta biblioteca es complementaria a una región única de un cromosoma. Todas las sondas juntas forman una red de DNA que es complementaria a todos los cromosomas del genoma humano.

Cada sonda es marcada con una molécula fluorescente que corresponde al cromosoma al cual es complementaria. Por ejemplo, las sondas que son complementarias al cromosoma 1 se marcan con moléculas amarillas, las que son complementarias al cromosoma 2 se marcan con moléculas rojas, y así sucesivamente.

Cuando las sondas son mezcladas con los cromosomas de una célula humana, la sonda hibridiza o se une al DNA de los cromosomas. Conforme esto sucede, las sondas fluorescentes tiñen el juego de cromosomas en un arco iris de colores. Posteriormente pueden utilizarse computadoras para analizar los cromosomas teñidos y determinar si existen traslocaciones u otras anomalías estructurales en éstos ¹¹⁵.

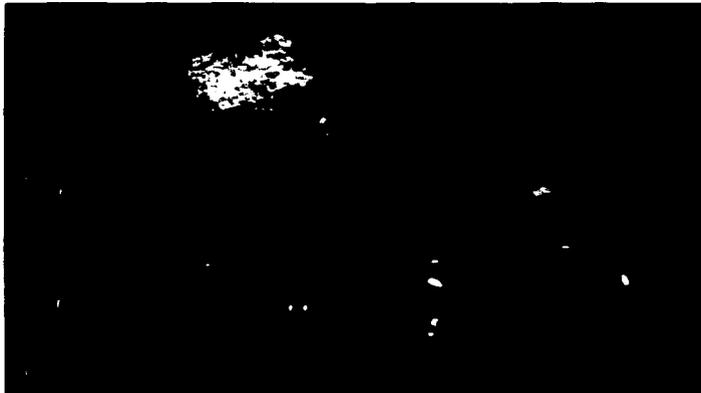


Fig. 148. Resultado de la técnica de SKY donde se observa cada uno de los cromosomas teñido de un color diferente.²⁰⁹

4.3 Microdissección Cromosomal

La Microdissección Cromosomal es una técnica que remueve físicamente una gran sección de DNA de un cromosoma completo. La cantidad mínima de DNA que puede ser aislada de esta manera es de 10 millones de pares de bases, cientos o miles de genes individuales.

Los científicos que estudian los cromosomas, llamados citogenetistas, son capaces de identificar cada cromosoma basándose en su patrón único de bandas oscuras y claras. Sin embargo, ciertas anomalías ocasionan que los cromosomas tengan patrones de bandas poco comunes. Por ejemplo, un cromosoma puede tener una pieza de otro cromosoma insertado dentro de éste, creando bandas extra. En otro caso, una porción de un cromosoma puede estar repetida una y otra vez, dando como resultado una banda oscura ancha. Debido a que los cromosomas de muchas células tumorales exhiben bandas irregulares, algunas aberraciones cromosomales se han asociado al cáncer y a desórdenes genéticos. En consecuencia, para entender más acerca de lo que causa estas condiciones, los científicos quieren determinar cuáles genes y secuencias de DNA están localizados en las regiones de los cromosomas que contienen estas bandas inusuales. La Microdissección cromosomal es un método relativamente nuevo de aislar estas regiones removiendo el DNA de la banda y logrando que esa área de DNA disponible para estudios posteriores.

Para preparar células para microdissección cromosomal, se tratan primero con un químico que obliga a las células a metafase. Posteriormente las células se dejan caer en un porta objetos de modo que el núcleo se rompa y libere los cromosomas sobre el porta objetos. Después, bajo un microscopio el científico localiza la banda específica de interés y, utilizando una aguja muy fina se desprende la banda del resto del cromosoma. Véase Fig. 149. Después se utiliza RCP para copiar el DNA de la banda y las copias obtenidas se utilizan para estudios posteriores ¹¹⁶.

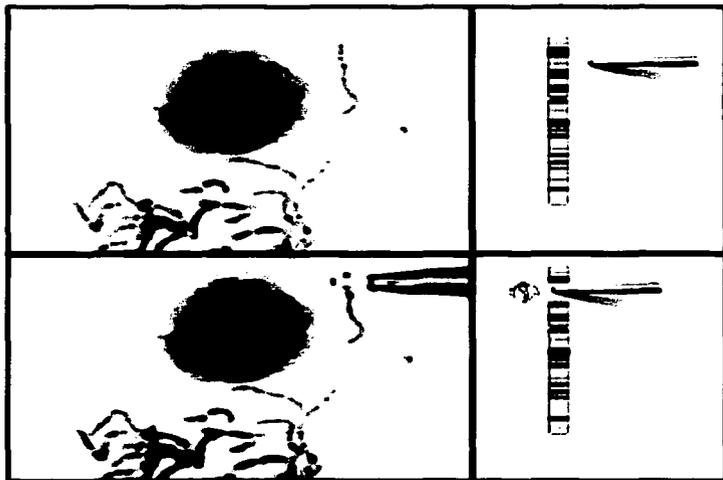


Fig. 149. Microdissección Cromosomal.²¹⁰

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

4.4 El Chip de DNA

Aunque se sabe que las mutaciones o alteraciones en el DNA dan como resultado ciertas enfermedades, es difícil identificar y caracterizar estas mutaciones porque la mayoría de los genes grandes tienen regiones en donde una mutación puede ocurrir. Ejemplos de estos genes son el BRCA1 y BRCA2, que se cree que ocasionan el 60% de los casos de cáncer ovárico y de mama hereditarios. Únicamente en el gen BRCA1 se han descubierto 500 mutaciones diferentes.

El microchip de DNA es una herramienta nueva utilizada para identificar mutaciones en genes como el BRCA1 y BRCA2. El chip, que consiste de una placa de vidrio pequeña encapsulada en plástico, está fabricado utilizando un proceso similar al utilizado para hacer microchips de computadora. En la superficie, cada chip contiene secuencias sintéticas de DNA de cadena simple idénticas a las de un gen normal.

Para determinar si un individuo posee una mutación para BRCA1 o BRCA2, se obtiene primero una muestra de DNA de sangre de una mujer, así como una muestra que no contenga mutación en ningún gen. Después de desnaturalizar o separar las muestras de DNA en cadenas sencillas y cortarlas en fragmentos más pequeños y manejables, se marcan los fragmentos con colores fluorescentes. El DNA de la paciente se marca con color verde y el DNA del individuo normal se marca con color rojo. Ambos juegos de DNA marcados se insertan en el chip y se dejan hibridar (o unir), al DNA sintético BRCA1 o BRCA2 en el chip.

Si la paciente no tiene una mutación para el gen, tanto la muestra roja como la verde hibridarán con las secuencias del chip. Si la mujer posee una mutación, el DNA rojo (normal) hibridará perfectamente con el DNA del chip, pero el DNA verde (paciente) no hibridará adecuadamente en la región donde se localice la mutación. Posteriormente se examina esta área para confirmar que la mutación está presente.

Debido a que la tecnología de chip es todavía nueva, es utilizada únicamente con propósitos de investigación. Los científicos esperan llevar a cabo estudios de población lo antes posible, para determinar, por ejemplo, con cuánta frecuencia las mujeres con una mutación en particular desarrollan cáncer de mama.

En el futuro, nuevos chips se desarrollarán para ayudar a evaluar los riesgos de otros tipos de cáncer, así como otras enfermedades, incluyendo enfermedades cardíacas y diabetes ¹¹⁷.

4.5 Tecnología de Microarreglo de DNA

Aunque todas las células en el cuerpo humano contienen el mismo material genético, no se activan los mismos genes en todas las células. Estudiar cuales genes se activan y cuales están inactivos en diferentes tipos de células ayuda a entender más acerca de la función de las células y qué pasa cuando una célula no funciona adecuadamente.

Anteriormente los científicos habían podido llevar a cabo tales experimentos en unos pocos genes al mismo tiempo. Con el desarrollo de la Tecnología de Microarreglo de DNA se pueden examinar actualmente miles de genes al mismo tiempo, un avance que ayudará a determinar las relaciones complejas entre los genes individuales.

Esta técnica está basada en una base de datos de más de 400,000 fragmentos de genes llamados "expresses secuenced tags" (ESTs). Cantidades minúsculas de cientos o miles de estos ESTs se acomodan en un porta objetos por un robot. Posteriormente, las moléculas genéticas mensajeras, que indican la producción de proteínas, se marcan desde una célula en particular con marcadores fluorescentes y se les permite hibridizar, o unirse a los ESTs sobre el porta objetos, las secuencias de los ESTs son complementarias a las de los mensajeros. Después de esto, un scanner mide la fluorescencia de cada muestra sobre el porta objetos; una fluorescencia intensa indica que muchos de los mensajeros formaron híbridos con los ESTs y por lo tanto, que el gen está muy activo en la célula. De manera inversa, si no hay fluorescencia se entiende que ninguno de los mensajeros formó híbridos con los ESTs y que el gen está inactivo en la célula. Ver Fig. 150.

Esta tecnología ayudará a los investigadores a aprender más acerca de diferentes enfermedades, cardiovasculares, mentales e infecciosas. Existe un área muy grande de la investigación con esta técnica dedicada al estudio del cáncer.

Años atrás, los científicos habían clasificado los diferentes tipos de cáncer basándose en los organismos en los cuales los tumores se desarrollan. Con la ayuda de la tecnología de microarreglo serán capaces de re-clasificar estos tipos de cáncer en base a los patrones de la actividad genética en las células tumorales y entonces será posible desarrollar estrategias de tratamiento dirigidas específicamente a un tipo de cáncer en particular ¹¹⁸.



Fig. 150. Tecnología de Microarreglo de DNA.²¹¹

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CONCLUSIÓN

Los verdaderos progresos en la historia de la humanidad son los que permitieron abrir nuevos horizontes, reales (geográficos) o virtuales (intelectuales), basta pensar en el descubrimiento de América o en la exploración del espacio interplanetario. En el terreno de la Biología Molecular y Genética se ha sucedido el mismo fenómeno, han sido una serie de eventos enlazados cronológicamente lo que ha llevado a los grandes avances y nuevos conceptos que utilizamos ahora como el DNA recombinante o el más nuevo "clon" tal como se aprecia en el primer capítulo de esta tesis. Hoy se está dando un nuevo gran paso, un progreso tanto real como intelectual, que abrirá un nuevo horizonte; pero esta vez ese horizonte se encuentra en el interior de nuestro cuerpo: la estructura y el papel de nuestros genes. Se trata de un horizonte muy vasto, porque en el cuerpo humano hay entre 50,000 y 100,000 genes (ignoramos su número exacto) y porque cada individuo, a excepción de los gemelos idénticos, tiene generalmente genes distintos de los de cualquier otro individuo. Así pues en el planeta hay miles de millones de genes que difieren en algún aspecto particular.

Hoy, podemos intervenir sobre los genes y en cualquier caso cambiar profundamente el estado de un individuo. Con los conocimientos adquiridos sobre lo que son y cómo funcionan los genes sabemos que en cierto modo los genes influyen en lo que un individuo hace o siente, porque determinan su constitución y su estructura. La calidad de vida viene determinada de forma compleja por muchos factores, que incluyen tanto los genes como el ambiente. La influencia de los genes puede ser más o menos fuerte según los individuos y es variable de un gen a otro. Además, cuando hablamos de genes no podemos referirnos a un gen único y aislado, porque un gen actúa siempre sobre el fondo de la acción de otros genes y del ambiente, capaces de modificar profundamente su aspecto.

Debido a la importancia de las premisas anteriores se ha hecho evidente en esta tesis el análisis de la estructura y función de la molécula que conforma a los genes: el DNA. Entre mayor sea el conocimiento que tengamos al respecto mayor serán nuestras posibilidades de ayudar a generar nueva información y aplicaciones en beneficio de nuestra sociedad. Las técnicas empleadas en Bioquímica y Biología Molecular se hacen presentes en esta tesis como las herramientas indispensables para lograr estos fines. De ahí la revisión que se hace en el documento de algunas de ellas y su utilidad para crear moléculas de DNA recombinante que son la base de las nuevas biotecnologías que se están aplicando con éxito en la industria, en el campo, en la salud y en muchos otros aspectos de nuestra vida diaria. Las consecuencias prácticas para las enfermedades genéticas serán cada vez más importantes en el futuro y se producirán en dos direcciones principales: la primera es la del diagnóstico, prevención y terapia de las enfermedades hereditarias y del cáncer; la segunda es la identificación y producción con fines médicos de productos génicos de alto valor terapéutico, por ejemplo, nuevas hormonas o bien sustancias apropiadas para prevenir enfermedades o trastornos de diversos tipos. Todo esto será el inicio de una nueva cultura en la humanidad, porque seguramente habrá intereses laborales, económicos y sociales muy vinculados a estos nuevos descubrimientos científicos. Por lo que también es importante tomar en cuenta los aspectos éticos del tema, después de todo, ¿los genes pertenecen a cada individuo ¿o pertenecen al gran conjunto de genes que constituyen la raza humana? ¿Tenemos derecho a manipular los genes en aras de un futuro mejor?

En la obtención de la información necesaria para la realización de este documento también se aprecia el uso de tecnología moderna ya que gran parte de las referencias son electrónicas. La Internet permite la comunicación de millones de computadoras en todo el mundo, interconecta redes y más redes y logra poner a nuestra disposición cantidades de información que pueden llegar a ser

inmanejables. El fenómeno de Internet tiene tres décadas. Sin embargo, es en la última cuando realiza su desarrollo explosivo y penetra en todas las ramas de la actividad humana. Ahora, en lugar de que nosotros vayamos hacia la información, es ella quien viaja hacia nosotros proveniente de muchos sitios; por lo que también es nuestra responsabilidad seleccionar aquel material que sea el más adecuado para nuestros propósitos. El concepto de *Globalización* no puede estar mejor representado que por la Internet. Su uso correcto nos permite tener información actualizada y reciente en cuestión de segundos como se podrá apreciar por algunos artículos utilizados en esta tesis que fueron obtenidos de Bibliotecas digitales y que tienen fechas de publicación de este año 2003, en comparación con las revistas que llegan a las hemerotecas seis meses después de la publicación del artículo. Por esa capacidad de colocarnos la información del mundo frente a nosotros es que ahora se habla de la *era de la información*.

La utilización de las técnicas del DNA recombinante y sus aplicaciones es, como todos los demás inventos y descubrimientos del ser humano, responsabilidad de aquel o aquella que los use. Aunque tal vez deberíamos tomar conciencia como sociedad de las implicaciones que esta nueva tecnología puede tener en nuestra sociedad y desarrollar normas y regulaciones especiales para este tipo de experimentos y no dejarlos en manos de ciertas instituciones. No hay duda de la grandeza que representa un logro como el Proyecto Genoma Humano, pero como futuros profesionistas y herederos de tales herramientas es nuestro deber conducirnos con ética y responsabilidad hacia nuestros congéneres y hacia todos los seres vivos de este planeta que habitamos.

LISTA DE ABREVIATURAS

Å	Angstrom	Unidad equivalente a 0.1 nm que todavía se emplea para expresar dimensiones atómicas y moleculares
A	Adenina	Una de las bases púricas con un anillo aromático de nueve miembros que forman parte del DNA.
α	Alfa	Nombre de una de las unidades que forma parte de la enzima RNA polimerasa.
ADP	Adenosin Difosfato	Nucleótido de importancia para el funcionamiento celular.
AMPc	Adenosin Monofosfato cíclico.	Molécula que funciona como señal molecular dentro de la célula.
ATP	Adenosin Trifosfato	Nucleótido que actúa como energía para el metabolismo celular.
C	Citosina	Conocida también como una de las bases pirimídicas, es una molécula aromática con un átomo de oxígeno en la posición 2 y un grupo amino en la posición 4.
°C	Grados centígrados	Unidad de medición de temperatura.
D	Dalton	Unidad equivalente a una unidad de masa atómica, el peso de un solo átomo de Hidrógeno (¹ H)
DNA	Acido Desoxirribonucleico	Llamada la molécula de la vida, es la clave de la transmisión de los caracteres hereditarios.
DNAss	Acido desoxirribonucleico de una sola cadena.	Tipo de DNA utilizado en ciertos procedimientos de Biología Molecular.
FAD	Dinucleótido de Adenina Flavina.	Molécula importante para el transporte de electrones dentro de la célula.
G	Guanina	Es una de las llamadas bases púricas, tiene un grupo amino en el segundo carbono y un átomo de oxígeno en el carbono seis, forma parte del DNA.
GDP	Guanosin Difosfato	Nucleótido que forma parte de la cadena de DNA
GMPC	Guanosin Monofosfato cíclico.	Nucleótido que funciona como señal molecular en la célula.
GTP	Guanosin Trifosfato	Nucleósido de igual importancia celular que GMP o GTP.
Hrs	Horas	Unidad de tiempo.
I	Inosina	Uno de los nucleótidos modificados que forman parte del RNAi.
kb	kilobases	Unidad equivalente a 1000 bases.
kda	kilodaltons	Unidad equivalente a 1000 daltons.
knt	kilonucleótidos	Unidad de medición de peso molecular del RNA
kpb	Kilopares de bases	Unidad equivalente a 1000 pares de bases.
µg	microgramos	Unidad de peso equivalente a 10 ⁻⁶ gramos.
mM	micrometros	Unidad de longitud equivalente a 10 ⁻⁶ metros.
NAD+	Dinucleótido de Adenina Nicotinamida reducido.	Molécula importante para el transporte de electrones dentro de la célula.
nm	nanómetros	Unidad de longitud equivalente a 10 ⁻⁹ metros.
pb	Pares de bases	Unidad para expresar el peso molecular en el DNA.
pg	Picogramos	Unidad de peso equivalente a 10 ⁻¹² gramos.

RNA	Ácido Ribonucleico	Molécula formada a partir del DNA cuya función es suministrar la información necesaria para la síntesis de proteínas.
RNA_m	RNA mensajero	Molécula intermediaria entre un gen y el polipéptido para el cual codifica.
RNA_r	RNA ribosomal	Molécula de RNA localizada en el ribosoma.
RNA_t	RNA de transferencia	Familia de RNA pequeño que traduce la información codificada del RNA _m a aminoácidos de un polipéptido.
RNA_{sn}	RNA nuclear pequeño	RNA de 90 a 300 nucleótidos de largo, necesario para procesar el RNA en el núcleo.
RNA_{hn}	RNA nuclear heterogéneo	Extenso grupo de moléculas de RNA que se encuentran en el núcleo, varían en peso molecular y en sus secuencias de nucleótidos.
ρ	"rho"	Nombre de uno de los factores importantes en el proceso de transcripción en procariotes.
S	Svedberg	Medida del índice de Sedimentación.
σ	"sigma"	Nombre de uno de los factores que está unido a la enzima RNA polimerasa.
T	Timina	Base pirimídica que posee un segundo átomo de oxígeno en la posición cuatro y un grupo metilo en la posición cinco. Forma parte de la cadena de DNA.
U	Uracilo	Base pirimídica que reemplaza a timina en el RNA.
UDP	Uracil Difosfato	Nucleótido de importancia en el RNA.
UV	Ultravioleta	Tipo de luz utilizada para visualizar fragmentos de DNA en un gel de electroforesis.
V/cm	Volts/centímetro	Unidad utilizada en el desplazamiento de un gel durante el proceso de electroforesis.
ψ	Pseudouridina	Uno de los nucleótidos modificados que forman parte del RNA _t .
5'-- 3'		Dirección de la cadena de DNA, puede ser la inversa, según sea el caso.

BIBLIOGRAFÍA

- 1) Science Watch Interviews. *An Interview with Sir Alec Jeffreys*.
http://www.sciencewatch.com/interview/sir_alec_jeffreys.htm (vi: 25-04-02)
- 2) Access Excellence. The National Health Museum. *Arthur Kornberg* (1918 -)
http://www.accessexcellence.org/AB/BC/Arthur_Kornberg.html (vi: 04-04-02)
- 3) Baltzer, F. **Theodor bovery**. *Science* 144, 809 – 815 (1964)
- 4) PBS on line. Biography: Dr. Francis Collins
<http://www.pbs.org/faithandreason/bio/coll-body.html> (vi: 25-04-02)
- 5) Blanchard, Susan M. (1998). **Friedrich Miescher, 1868. The early History of Cell Biology**.
- 6) *Briefing Notes on Dolly*. Roslin Institute Press Notice PN97-03
- 7) Castle, William Ernest (1903). **Mendel's Law of heredity**. Cambridge. M.A.
- 8) xrefer. Digital Reference Library. *Chargaff, Edwin* (1905).
<http://w1.xrefer.com/entry/494172> (vi: 04-04-02)
- 9) Tadox.net. Charles Darwin: *La Evolución*
<http://www.tadox.net/lectornet/.../darwin.htm> (vi: 11-03-02)
- 10) Comfort Nathaniel C. **"Two genes, no enzyme: a second look at Bárbara McClintock and the 1951 Cold Spring harbor Symposium**. *Genetics* 140: 1161 – 1166 (1995).
- 11) Sigma Xi. The Cientific Research Society. *Computing Science: Genetic Code*
<http://www.sigmaxi.org/amsci/issues/comsci987compsci9801.html> (vi: 04-04-02)
- 12) *"De Vries, Hugo Marie"* Microsoft (R) Encarta(R) 98 Encyclopedia. (c) 1993-1997 Microsoft Corporation
- 13) DNA Diagnostic Center *"Spiraling Through Genetic History"*
<http://www.dnacenter.com/geneticshistory.html> (vi: 18-03-02)
- 14) Dunham et al (1999): **The DNA secuence of human chromosome 22**. *Nature* 402, 489 – 495.
- 15) Eric Weisstein's World of scientific Biography
<http://science.word.wolfram.com/biography/chargaff.html> (vi: 04-04-02)
- 16) The Medical Research Council. Laboratory of Molecular Biology. *Fred Sanger – 1958*.
<http://www2.mrc-lmb.cam.ac.uk/archive/Sanger58.html> (vi: 05-04-02)
- 17) Garrod, A. **The Incidence of alkaptonuria: A study in chemical individuality**. *Lancet* 2, 1616 – 1620 (1902).
- 18) Genome news Network *Archibald E. Garrod (1857-19369 postulates that genetics defects cause many inherited diseases*.
http://gnn.tigr.org/timeline/1908_Garrod.shtml (vi: 18-03-02)

- 19) Hershey A.D. y M. Chase, 1952. **Independent functions of viral protein and nucleic in growth of bacteriophage.** J. Gen. Physiol. 36: 39-56.
- 20) Kohler Robert. **Lords of the fly: Drosophila genetics and the experimental life**, Chicago: University of Chicago Press, 1994.
- 21) Lane, Jo Ann. "*History of Genetics Timeline*". 1994 Woodrow Wilson Collection. Access Excellence. The National Health Museum. <http://www.accessexcellence.org/AE/AEPC/wwc/1994/geneticstln.html> (vi: 01-03-02)
- 22) University of California. Cognitive Cultural Studies. *Landmarks in the History of Genetics* http://cogweb.ucla.edu/EPN/DNA_history.html (vi: 01-03-02)
- 23) Maupertuis, Pierre Louis Moreau de (1745). *Venus Physique*. La Haye.
- 24) Mayo Clinic.- Division of laboratory. *Genetics History* <http://www.mayo.edu/labgenet/history.html> (vi: 18-03-02)
- 25) McClintock, Bárbara (1987). **The Discovery and Characterization of transposable Elements:**The Collected Papers of barbara McClintock. New York. Garland. 1987.
- 26) Mckusick, V.A. Walters S. Sutton and the physical basis of Mendelism. Bull Hist Med 34, 487 - 497 (1960).
- 27) Mendel, Gregor (1963). **Experiments in Plant Híbridisation**. Cambridge, M.A: Harvard University Press.
- 28) Molecular Biologist.com. "*A concise History of Molecular Biology and Genetics*" <http://www.molecular-biologist.com> (vi: 01-03-02)
- 29) Muller, Herman J. (1962). **Studies in Genetics**.
- 30) Josiah Macy, Jr. Foundation. DNA from the Beginning. *Nettie Stevens* http://www.dnafb.org/dnafb/concept_4/con9bio.html (vi: 18-03-02)
- 31) Karolinska Institutet. Nobel Prize in Physiology or Medicine 1958 - *Presentation Speech* <http://www.nobel.se/medicine/laureates/1958/press.html> (vi: 02-04-02)
- 32) The Nobel Assembly at the Karolinska Institute. Physiology or Medicine 1978-Press Release <http://www.nobel.se/medicine/laureates/1978/press.html> (vi: 05-04-02)
- 33) Pierre-Louis Moreau de Maupertuis. <http://library.thinkquest.org/19926/text/library/bios/maupertuis.htm> (vi: 11-03-02)
- 34) US Agricultural Research Service. National Agricultural Library. *Pulse field gel Electrophoresis*. <http://www.nal.usda.gov/pgdic/probe/v2n3/puls.html> (vi: 05-04-02)
- 35) Reiner, Julius. **Der Beitrag von friedrich Miescher d. J., 1849 - 1895, zur Geschichte der Zellbiologie**. Basel, 1963.
- 36) "RNA codewords and protein synthesis" (with Philip Leder) in *Science*, 1964.

- 37) Rose, David. Notes from Underground. *The Politics of Ascospores*
<http://www.comafungi.org/nfusum01.htm> (vi: 27-03-02)
- 38) Summers, W.C. and W. Szybalski. 1967. Y-irradiation of deoxyribonucleic acid in dilute solutions: I. A sensitive method for detection of single-strand breaks of polydisperse DNA samples (bacteriophage, *Sarcina lutea*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Cryptophaga johnsonii*). *J. Mol. Biol.* 26: 107-123
- 39) Stent, Gunther. "Max delbruck", in **phage and the origins of Molecular Biology**.— expanded Edition.— Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1992.
- 40) Sturtevant, Alfred Henry. 1891 – 1970. Pamphlet published for Sturtevant's memorial service. Pasadena CA.
- 41) St. Edward's University. Student Interactive Tutorials. *Table of Historical Events in Genetics/Molecular Biology*.
<http://www.cs.stedwards.edu/~kswank/historytable.html> (vi: 27-03-02)
- 42) "The dependence of cell-free protein synthesis in *E. Coli*, upon naturally occurring or Synthetic polyribonucleotides" (with Johann Matthaei) in Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States, 1961.
- 43) "The Genetic Code II". *Scientific American*, March 1963.
- 44) TIME.com. <http://www.time.com/time/poy2000/mag/venter.html> (vi: 01-05-02)
- 45) *Transgenic Animals*. <http://www.frame.org.uk/Transgenics.htm> (vi: 25-04-02)
- 46) U.S. Policy on Biotechnology-*Tomatoes*.
<http://www.usis.usemb.se/biotech/tomatoes.html> (vi: 01-05-02)
- 47) Watson, James; Crick, Francis. A structure for DNA. *Nature* 171: 737 (1953)
- 48) Krimea, Geographical Information.
<http://www.euronet.nl/users/sota/krimgeo.html> (vi: 01-05-02)
- 49) The Nobel Assembly at Karolinska Institute. *Francois Jacob*. Biography.
<http://www.nobel.se/laureates/1965/Jacob-bio.html> (vi: 04-04-02)
- 50) The Nobel Assembly at karolinska Institute. *Physiology or Medicine 1975*- Press Release
<http://www.nobel.se/medicine/laureates/1975/press.html> (vi: 05-04-02)
- 51) The Royal Swedish Academy of Sciences. *The 1980 Nobel Prize in Chemistry*.
<http://www.nobel.se/medicine/laureates/1980.press.html> (vi: 05-04-02)
- 52) Cibelli, Jose B. Lanza, Robert P., et al. The First Human Clone. *Scientific American*. January 2002. 45-50.
- 53) Thomas Hunt Morgan at Columbia University.
<http://www.columbia.edu/cu/alumni/Magazine/Legacies/Morgan/> (vi: 18-03-02)

- 54) **La Biblia**. Génesis Cap. 1; ver 3, 22. Edt. Sopena. – Argentina: 1959. Traducción hecha por Félix Torres Amat.
- 55) **The National Human Genome Research Institute**. From Maps to Medicine: *About the Human Genome Research Project*.
http://www.nhgri.nih.gov/policy_and_public_affairs/Communications/Publications.../about.html (vi: 25-04-02)
- 56) **Medical Experiments of the Holocaust and Nazi Medicine**.
<http://www.remember.org/educate/medexp.html> (vi: 04-09-02)
- 57) **Gershon Elliot et al. *The Gay Gene: Ongoing Studies***. National Institute of mental Health.
<http://members.aol.comgaygene/pages/studies.htm> (vi: 04-09-02)
58. **Karp, Gerald. *Biología Celular y Molecular***.—McGraw Hill Interamericana: México, D.F. 1998.
59. **Access Excellence, The National Health Museum. *Structure of DNA***.
<http://www.accessexcellence.org/AB/GG/structure.html>. (vi: 13-06-02)
60. **Gregor. The Molecular Genetics virtual Tutor. *Right. html***
<http://gregor.rutgers.edu/> (vi: 17-06-02)
61. **Gregor. The Molecular Genetics virtual Tutor. *Cytasine***
<http://gregor.rutgers.edu/DNAstructure/RightSource2.html> (vi: 17-06-02)
62. **Gregor. The Molecular Genetics virtual Tutor. *Guanine***
<http://gregor.rutgers.edu/DNAstructure/DNA2.html> (vi: 17-06-02)
63. **The University of Arizona. Biology Learning Center. *Introduction to DNA Structure***.
http://www.blc.arizona.edu/Molecular_Graphics/DNA_Structure/DNA_Tutorial.html
64. **What are Nucleosides and Nucleotides?**
<http://users.ren.com/jkimball.ma-ultranet/BiologyPages/N/Nucleotides.html> (vi: 17-06-02)
65. **All About DNA**
<http://www.geocities.com/CapeCanaveral/Hangar/4344/section01.html> (vi: 26-08-02)
66. **Nucleic Acid database. An Introduction to Nucleic Acids**.
<http://ndbserver.rutgers.edu/NDB/archives/NAintro/index.html> (vi: 14-06-02)
67. **RNA Structure**.
http://www.scf.usc.edu/~chem203/resources/DNA/rna_structure.html (vi: 13-09-02)
68. **DNA Supercoiling and Topoisomerases**
<http://education.vsnl.com/keedar/> (vi: 20-09-02)
69. **de Duve, Christian. *The Beginnings os Life on Earth***. *American Scientist*: September–October 1995.
70. **Rothamsted Research. Molecular Biology Notebook. *RNA Structure***.
<http://www.rothamsted.bbsrc.ac.uk/notebook/courses/guide/rnast.htm> (vi: 13-09-02)

71. RNA Structure
<http://www.web-books.com/MoBio/Free/Ch3C.htm> (vi: 13-09-02)
72. New Century College. George Mason University. *Structure and Function of RNA*
<http://www.ncc.gmu.edu/dna/rna.htm> (vi: 13-09-02)
73. In Touch Live.com: Cancer Prevention, Early Detection and Treatment. *Structure and Function of Genes*.
<http://www.intouchlive.com/cancergenetics/genefx.htm> (vi: 27-09-02)
74. The University of Strathclyde in Glasgow. Molecular Genetics. *Introduction to Transcription*.
<http://homepages.strath.ac.uk/~dfs97113/BB310/Lect12/Lect12.html> (vi: 10-10-02)
75. Andrews University Biology Department. *Transcription and the Genetic code*.
<http://www.andrews.edu/biology/gen/112.htm> (vi: 27-09-02)
76. The University of strathclyde in Glasgow. *The Basal Transcription Complex: RNA Polymerases and Associated Factors*.
<http://homepages.strath.ac.uk/~dfs97113/BBio/lect13/lect13.html> (vi: 27-09-02)
77. McClean Phillip. *Control of Gene Expression in Eukaryotes*. North Dakota State University-Fargo, N.D <2003>
<http://www.ndsu.nodak.edu/> (vi: 27-09-02)
78. Sentenac, André. *Genetic Expression in Eukaryotes:DNA Transcription*.
http://www.dsv.cea.fr/thema/sbgm/web_sbgm/pages_sbgm_u.../initiation_transcription_uk.html
(vi: 27-09-02)
79. The University of the Basque Country. *Ácidos Nucleicos. RNA*
<http://www.ehu.es/biomoleculas/AN/an3.htm> (vi: 10-10-12)
80. Universidad de Murcia. *Aula Virtual de Biología*.
<http://www.um.es/~molecula/anuc103.htm> (vi: 08-10-12)
81. The University of Strathclyde in Glasgow. *Events after Transcriptional Initiation*.
<http://homepages.strath.ac.uk/~dfs97113/BB310/Lect18/lect18.html> (vi: 10-10-02)
82. Transcripción del ARN.
<http://www.angelfire.com/bc2/biologia/adna.htm> (vi: 08-10-12)
83. Introducción a la Biología Molecular.
<http://www.geocities.com/CapeCanaveral/Lab/9232> (vi: 08-10-12)
84. Fairbanks, Daniel J. Andersen W. Ralph. **Genetics. The Continuity of Life.**—Brooks/Cole Publishing Company.—USA: 1999.
85. The University of Strathclyde in Glasgow. *Nuclear pre-mRNA splicing*.
<http://homepages.strath.ac.uk/~dfs97113/BB310/Lect19/lect19.html> (vi: 10-10-02)
86. Universidad de Granada. *Expresión de la Información Genética*.
http://www.ugr.es/~cianez/Microbiologia/10_Micro.html (vi: 19-10-02)

87. Estructura de la célula. *Ribosomas y Polirribosomas*.
<http://www.preunet.cl/demo/cursos/espbio/cap/celula/riboso.htm> (vi: 19-10-02)
88. Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. Universidad de Córdoba. *Síntesis de Proteínas*
<http://www.efn.uncor.edu/dep/biologfa/intrbiol/adntema2.htm> (vi: 19-10-02)
89. Yoshihama Maki, Tamayo Uechi et al. The Human Ribosomal Protein Genes: secuencing and Comparative Análisis of 73 Genes. *Genome Research* 12: 379 – 390. 2002.
90. Rappsilber Juri, Ryder Ursula et al. Large-Scale Proteomic Analysis of the Human Spliceosoma. *Genome Research* 12: 1231-1245. 2002.
91. Zhang et al. Identification and Analysis of Over 2000 ribosomal Protein pseudogenes in the Human Genome. *Genome Research* 12: 1466-1482. 2002.
92. Howe, Kenneth J. RNA Polymerase II conducts a symphony of pre-mRNA processing activities. *Biochimica et Biophysica Acta* 1577 (2002) 308 – 324.
93. Gnatt, Averell. Elongation by RNA Polimerase II: Structure-Function relationship. *Biochimica et Biophysica Acta* 1577 (2002) 175 – 190.
94. Richardson, John P. Rho-dependent termination and ATPases in transcript termination. *Biochimica et Biophysica Acta* 1577 (2002) 251 – 260.
95. Kobar, Michael S. Greenblatt, Jack. *Regulation of transcription elongation by phosphorylation*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1577 (2002) 261 – 265.
96. Watson, James D. **La Doble Hélice**. —2 Ed. —Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. México D.F: 1981.
- 97.- Freeland, Horace. **El ADN: Clave de la Vida**. —Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. México D.F: 1981.
- 98.- *Regulación de la Expresión Génica*.
<http://www.arrakis.es/~lluengo/regulacion.html> (vi: 20-02-03)
- 99.- Universidad Pública de Navarra. *Expresión de la Información Genética*.
<http://www.unavarra.es/genmic/curso/%20microbiologia%20general/O8-expresion%20de%20la%20informacion%20genetica.htm>. (vi: 20-02-03)
- 100.- Huarpe. Sitio Educativo. Mendoza Argentina. *Genética del Desarrollo*
<http://www.huarpe.com/gen/posgrado/temario/gendesa.html> (vi: 20-02-03)
- 101.- Los animales clonados presentan anomalías en la expresión genética.
<http://www.ondasalud.com/edicion/compo.../0,3039,34031,00.html> (vi: 20-02-03)
- 102.- Tecnología del DNA recombinante.
<http://webcd.usal.es/web/transgen00/Unidades/Document00/klein/TEMA15.htm>
(vi: 25-11-02)

- 103.- Biotechnology Industry Organization. *Cloning Genes*.
<http://web.mit.edu/esgbio/www/rdna/cloning.html> (vi: 25-11-02)
- 104.- Fawcett Timothy William. Ph.D. **Recombinant DNA Techniques**. Life Technologies, Inc. Training Center.
- 105.- Access Excellence. The National Health Museum. *Recombination Up Close*. « Biotechnology in Perspective » Washington D.C ;
http://www.accessexcellence.org/AB/BC/Recombination_Up_Close.html (vi: 26-11-02)
- 106.- Access Excellence. The National Health Museum. *Restriction Enzyme Action of EcoRI*.
<http://www.accessexcellence.org/AB/GG/restriction.html> (vi: 28-11-02)
- 107.- The University of Strathclyde in Glasgow. BB310 *Restriction Enzymes*.
<http://homepages.strath.ac.uk/~dfs99109/BB310/ResEnz.html> (vi: 03-12-02)
- 108.- Welcome to the University of Oklahoma's Advanced Center for Genome Technology. *Recombinant DNA. General Methods*.
http://www.genome.ou.edu/protocol_book/protocol_partI.html (vi: 25-11-02)
- 109.- Wang Yongxin, Fugaro Joseph. A simple method for generating full length cDNA from low abundance partial genomic clones. *BMC Molecular Biology* (2000) 1:2
- 110.- Southern, Northern, Westerns and Cloning. Molecular Searching Techniques.
<http://web.mit.edu/esgbio/www/rdna/rdna.html> (vi: 25-11-02)
- 111.- Access Excellence. The National Health Museum. *Transfer and Cloning of the Insulin Gene*.
http://www.accessexcellence.org/AB/GG/transfer_and.html (vi: 26-11-02)
- 112.- Sitio de Clonación Múltiple de pUC19. Croase, J. and Armoresc, D. *Focus* 8: 3,9 (1986)
- 113.- Cloning into a Yeast Artificial Chromosome (YAC). Burke, D.T. Carle, G.F. Olson M.V. *Science* 236: 806 – 812, 1987.
- 114.- Access Excellence. The National Health Museum. *Polimerase Chain Reaction (PCR)*
<http://www.accessexcellence.org/AB/GG/polymerase.html> (vi: 28-11-02)
- 115.- National Human Genome Research Institute fact sheet. *Spectral Karyotyping (SKY)*
http://www.accessexcellence.org/AB/GG/nhgri_PDFs/SKY_TXT.pdf (vi: 28-11-02)
- 116.- National Human Genome Research Institute fact sheet. *Chromosome Microdissection*.
http://www.accessexcellence.org/AB/GG/nhgri_PDFs/C_microdissection.pdf
(vi: 28-11-02)
- 117.- National Human Genome Research Institute fact sheet. *DNA Chip Technology*
http://www.accessexcellence.org/AB/GG/nhgri_PDFs/dna_chip.pdf (vi: 28-11-02)
- 118.- National Human Genome Research Institute fact sheet. *DNA Microarray Technology*.
http://www.accessexcellence.org/AB/GG/nhgri_PDFs/microarray_technologyTXT.pdf
(vi: 28-11-02)
- 119.- Dulbecco, Renato. **Los genes y nuestro futuro**. —Alianza Editorial. Madrid, España: 1999.

- 120.- M2 Presswire – 14 April 2003 – UK Government. Heads of Government congratulate scientist on completion of Human Genome Project (c) 1999-2003. M2 COMMUNICATIONS LTD.
- 121.- Henry, Celia M. Human Genome project to celebrate DNA Anniversary. *Chemical & Engineering News*, Washington; Mar 10, 2003.
- 122.- Pears, Christen. Designs on DNA. *Northern Echo, Darlington (UK)*; April 21, 2003.
- 123.- Hood Leroy, Galas David. The Digital Code of DNA. *Nature*, London; Jan 23, 2003. Vol 421:6921, 444-448.
- 124.- Smirnov serge, Matray Tracy J., Kool Eric T., De los Santos Carlos. Integrity of duplex structures without hydrogen bonding: DNA with pyrene paired at abasic sites. *Nucleic Acids Research*; Oxford, Dec 15, 2002. Vol 30: 24. 5561 – 5568.
- 125.- Immunology; Novel DNA molecules are potent, selective e immunoregulators. *Gene Therapy Weekly*; Atlanta. Nov 21, 2002. 12-18.
- 126.- M2 Presswire – 31 March 2003 – UK Government. Scientist mum wins prestigious new prize. M2 COMMUNICATIONS LTD.
- 127.- Kawasaki and Colleagues. Oct6, a transcription factor controlling myelination, is a marker for active nerve regeneration in peripheral neuropathies. *Acta Neuropathologica*, 2003; 205(3): 203-208.
- 128.- Fan and Colleagues. A novel human ww domain-containing protein, interacts with the phosphorylated RNA polymerase II. *Biochemical Biophysical Research Communications*, 2003; 301(2): 378-385.
- 129.- Denko and Colleagues. Hipoxia actively represses transcription by inducing negative cofactor 2 (Dr1/DrAP1) and blocking preinitiation complex assembly. *Journal of Biological Chemistry*, 2003; 278 (8): 5749 – 5755.
- 130.- Iborra, F.J., Jackson, D.A., Cook, P. R. Traslation in the Nucleus. *Science* 293, 1139(2001): 1139.
- 131.- Kimball, Scot R. Regulation of global ans specific mRNA traslation by amino acids. *The Journal of Nutrition*; Bethesda; May 2002. Vol 132 No. 5: 883 – 886.
- 132.- Squires, Catherine; Zaporjets Dmitry. Proteins shared by the transcription and traslation machines. *Annual Review of Microbiology*; Palo Alto: 2000, Vol 54: 575 – 598.
- 133.- Oikawa and colleagues. Molecular Biology of the Ets family of transcription factors. *Gene*, 2003; 303: 11-34.
- 134.- Figura 1. <http://www.yspark.com/biblepainting/O2st.mary/O2presentation/circumscion.htm>
- 135.- Figura 2. <http://www.briantaylor.com/Plato.htm>
- 136.- Figura 3. <http://www.groups.dcs.st-and.ac.uk/history/Pictdisplay/Maupertuis.html>
- 137.- Figura 4. <http://www.2.lucidcafe.com/lucidcafe/library/96feb/darwin.html>

- 138.- Figura 5. <http://www.geocities.com/ResearchTriangle/Lab/2513/mendel.htm>
- 139.- Figura 6. <http://www.mun.ca/biology/dinnes/B2250/sept5/sld026.htm>
- 140.- Figura 7. <http://www.chu.es/biomoleculas/AN/an1.htm>
- 141.- Figura 8. <http://www.bixier.de/stars.htm>
- 142.- Figura 9. <http://www.accessexcellence.org/AB/GG/mitosis.html>
- 143.- Figura 10. <http://home.datacom.ch/biografien/vries.htm>
- 144.- Figura 11. http://gnn.tigr.org/timeline/1902_Bovery_Sutton.html
- 145.- Figura 12. <http://www.mala.bc.ca/~mcneil/stevens.htm>
- 146.- Figura 13. http://www.mun.co/biology/scarr/Archibald_Garrod.htm
- 147.- Figura 14. <http://www.nobel.se/medicine/laureates/1933/index.html>
- 148.- Figura 15. <http://www.columbia.edu/cu/alumni/Magazine/legacies/Morgan>
- 149.- Figura 16. <http://zygote.swarthmore.edu.cleave1.html>
- 150.- Figura 17. http://www.library.ucsf.edu/ucsfhistory/chapter3/chapter3_04.html
- 151.- Figura 18. <http://www.pathology.washington.edu/galleries/cytogallery/cytogallery.html>
- 152.- Figura 19. <http://www.nobel.se/medicine/laureates/1946/muller-bio.html>
- 153.- Figura 20. <http://www.nybg.org/bsci/libr/Dodge5.htm>
- 154.- Figura 21.
http://www.lectura.ilce.edu.mx:3000/sites/ciencia/volumen3/ciencia3/125/htm/sec_5.htm
- 155.- Figura 22. http://www.icp.ac.ru/RAS_1724-1999/CD_PAH/ENG/01/0192.htm
- 156.- Figura 23. <http://www.nobel.se/medicine/laureates/1958/index.html>
- 157.- Figura 24. <http://www.nobel.se/medicine/laureates/a969/index.html>
- 158.- Figura 25. http://www.dnaftb.org/dnaftb/concept_17/con17bio.html
- 159.- Figura 26. <http://profiles.nlm.nih.gov/LL/>
- 160.- Figura 27. http://agora.qc.ca/mot.nsf/Dossiers/Erwin_Chargaff
- 161.- Figura 28. http://www.mun.ca/biology/scarr/Hershey_&_Chase_1959.htm
- 162.- Figura 29. <http://fai.unnc.edu.ar/biologia/adn/adntema1.htm>
- 163.- Figura 30. <http://www.time.com/time/time100/scientist/profile/watsoncrick.html>

- 164.- Figura 32. <http://www.student.vxu.se/home/cmafr92/scientist/Gamov.html>
- 165.- Figura 34. http://www.accessexcellence.org/AB/BC/Arthur_Kornberg.html
- 166.- Figura 35. http://www.nobel.se/medicine/laureates/1965/Jacob_bio.html
- 167.- Figura 36. <http://www.namasthenri.com/NR1oftheweek/0910.html>
- 168.- Figura 37. http://mcardle.oncology.wisc.edu/faculty_staff/szybalski_w.html
- 169.- Figura 38. <http://www.nobel.se/medicine/laureates/1975/index.html>
- 170.- Figura 39. <http://www.nobel.se/medicine/laureates/1978/index.html>
- 171.- Figura 40. <http://www.nobel.se/chemistry/laureates/1980/index.html>
- 172.- Figura 41. <http://www.nobel.se/medicine/laureates/1986/index.html>
- 173.- Figura 42. http://www.esr.cri.nz/features/esr_and_dna/history/
- 174.- Figura 43. <http://www.gene.com/gene/research/>
- 175.- Figura 44.
<http://www.msri.org/publications/In/msri/1998/genome/botstein/1/banner/36.html>
- 176.- Figura 45. <http://www.creationsensation.com/MuseumStore/microscopebiologykits.htm>
- 177.- Figura 46. http://www.nobel.se/chemistry/laureates/1993/mullis_autobio.html
- 178.- Figura 47. http://www.nobel.se/chemistry/laureates/1993/mullis_autobio.html
- 179.- Figura 48. <http://www.ucsf.edu/levylab/pages/drlevy.html>
- 180.- Figura 49.
http://www.biology.fullerton.edu/courses/biol_3027web/browser/moreabout.html
- 181.- Figura 50. <http://bmc.bu.edu/faculty/cantor.html>
- 182.- Figura 51. <http://www.gs.washington.edu/faculty/olson.htm>
- 183.- Figura 52. http://www.hhmi.org/research/investigators/popups/leder_fig.html
- 184.- Figura 53. http://www.hhmi.org/research/investigators/popups/leder_fig.html
- 185.- Figura 54. http://www.sciencewatch.com/inteviews/sir_alec_jeffreys.htm
- 186.- Figura 55. <http://www.pbs.org/farthandreason/bio/index-frame.html>
- 187.- Figura 56.
http://www.nih.gov/policy_and_public_affairs/communications/publications/Maps_to_medicine/about.html
- 188.- Figura 57. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/disease/>

- 189.-Figura 58. <http://www.vwinnipeg.ca/~simmons/yeast.htm>
- 190.- Figura 59. <http://www.organicconsumers.org/purelink.html>
- 191.- Figura 60. <http://mendel.medgen.ubc.ca/medgen/scwis.html>
- 192.- Figura 61. <http://www.usis.usemb.se/biotech/tomatoes.html>
- 193.- Figura 62. <http://www.esgt.org>
- 194.- Figura 63. <http://www.time.com/time/poy2000/mag/venter.html>
- 195.- Figura 64. <http://www.sciencemuseum.org.uk/on-line/dolly/special.asp>
- 196.- Figura 65. <http://www.sciencemuseum.org.uk/on-line/dolly/index.asp>
- 197.- Figura 66. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/guide/H5Chr21.shtml>
- 198.- Figura 67. <http://www.ornl.gov/hgmis/>
- 199.- Figura 68. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/guide/H5Chr22.shtml>
- 200.- Figura 76. http://www.accessexcellence.org/AB/GG/dna_molecule.html
- 201.- Figura 77. Drew H.R. Wing, R. et al. Structure of a B-DNA Dodecamer. Conformation and Dynamics. *Proc.Nat.Acad.Sci. USA*, 78. pp 2179-2183, 1981.
- 201.- Figura 78. Shakked Z, et al. The Conformation of the DNA Double Helix in the Crystal is dependent on its Environment. *Nature*, 342, pp 456-460. 1989.
- 202.- Figura 79. Wang J, et al. Molecular Structure of a Left-Handed Double Helical DNA Fragment at Atomic Resolution. *Nature*, 282, p 680-686. 1979.
- 203.- Figura 87. <http://www.web-books.com/MoBio/Free/Ch3E3.htm>
- 204.- Figura 88. Aula Virtual de Biología. <http://www.um.es/~molecula/anuc103.htm>
- 205.- Figura 89 y 90. <http://www.web-books.com/MoBio/Free/Ch3C2.htm>
- 206.- Figura 91. <http://www.web-books.com/MoBio/Free/Ch3C4.htm>
- 207.- Figura 121. Cell Breakage and Fractionation-Part 1. http://www.accessexcellence.org/AB/GG/garland_PDFs/Panel_5.04b.pdf
- 208.- Figura 144. <http://www.accessexcellence.org/AB/GG/YAC.html>
- 209.- Figura 148. National Human Genome Research Institute (NHGRI) by Artist Darryl Leja. <http://www.accessexcellence.org/AB/GG/sky.html>
- 210.- Figura 149. National Human Genome Research Institute (NHGRI) by Artist Darryl Leja. <http://www.accessexcellence.org/AB/GG/microDissection.html>

211.- Figura 150. National Human Genome Research Institute (NHGRI) by Artist Darryl Leja
<http://www.accessexcellence.org/AB/GG/microArray.html>

212.- Tabla 3. <http://fai.unne.edu.ar/biologia/adn/adntema2.htm>