

BIOLOGÍA MOLECULAR

Gabriela Verónica Díaz
María Mercedes Tiscornia
Pedro Darío Zapata
María Isabel Fonseca

Colección: Cuadernos de Cátedra

Asignatura: Biología Molecular

Carrera: Profesorado Universitario en Biología

Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales

Año de publicación: 2026



Facultad de Ciencias Exactas,
Químicas y Naturales

Biología molecular / Gabriela Verónica Díaz ... [et al.]. - 1a ed. - Posadas : Universidad Nacional de Misiones, 2026.
Libro digital, PDF - (Cuadernos de cátedra)

Archivo Digital: descarga y online
ISBN 978-950-766-283-6

1. Biotecnología. 2. Biología Molecular. 3. Educación
Universitaria. I. Díaz, Gabriela Verónica
CDD 573.848

Índice

| | |
|--|----|
| PREFACIO | 1 |
| CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN A LA BIOLOGÍA MOLECULAR | 3 |
| CONCEPTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR | 3 |
| FUNDAMENTOS MOLECULARES Y CELULARES DE LA HERENCIA: RELACIÓN ENTRE LA GENÉTICA MOLECULAR Y MENDELIANA | 3 |
| Leyes de Mendel..... | 3 |
| Genotipo y fenotipo | 6 |
| Alelismo múltiple y organismo diploide..... | 8 |
| ESTRUCTURA DE LOS ÁCIDOS NUCLEICOS | 8 |
| Estructura del nucleótido..... | 9 |
| Estructura primaria del ADN..... | 9 |
| Estructura secundaria del ADN – Modelo de Watson y Crick | 10 |
| Propiedades del B-ADN | 11 |
| Propiedades de los ácidos nucleicos en disolución | 12 |
| Consecuencias biológicas del modelo del B-ADN | 13 |
| Variaciones de la estructura secundaria del ADN: forma Z y forma A del ADN.... | 13 |
| Estructura de orden superior del ARN..... | 14 |
| Estructuras de orden superior del ADN | 14 |
| Niveles de condensación del ADN | 15 |
| EL LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR | 17 |
| NORMAS DE SEGURIDAD E HIGIENE EN EL LABORATORIO | 17 |
| Normas de seguridad generales | 17 |
| Normas de seguridad relacionadas con el orden y la limpieza del laboratorio | 18 |
| Normas de seguridad relacionadas con la utilización de productos químicos..... | 18 |
| Normas de seguridad relacionadas con el tratamiento de los residuos..... | 19 |
| Aspectos para considerar durante su trayecto en el desarrollo de cada TP de Biología Molecular | 19 |
| <i>Reflexión para la práctica docente</i> | 21 |
| TALLER Y TRABAJO PRÁCTICO n.º 1: EL LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR - EXTRACCIÓN DE ADN | 22 |

| | |
|--|-----------|
| OBJETIVOS | 22 |
| FUNDAMENTO TEÓRICO DEL LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR | 22 |
| Áreas principales del laboratorio de biología molecular | 22 |
| Instrumentos y equipos habituales..... | 23 |
| Materiales y elementos de uso frecuente..... | 23 |
| FUNDAMENTO TEÓRICO SOBRE PREPARACIÓN DE SOLUCIONES USADAS EN EL LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR | 25 |
| Concepto y tipo de soluciones | 26 |
| Unidades de concentración más usadas para preparar soluciones en biología molecular | 27 |
| Preparación de soluciones de trabajo a partir de soluciones madre | 28 |
| <i>Reflexión para la práctica docente</i> | 31 |
| FUNDAMENTO TEÓRICO SOBRE LA EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ADN | 32 |
| 1. Lisis celular..... | 33 |
| 2. Purificación del ADN | 39 |
| 3. Precipitación del ADN..... | 40 |
| 4. Lavado, rehidratación y almacenamiento del ADN | 41 |
| Un caso especial: aislamiento de plásmidos..... | 41 |
| <i>Reflexión para la práctica docente</i> | 42 |
| FUNDAMENTO TEÓRICO SOBRE LA EXTRACCIÓN DE ARN | 43 |
| Diferencias entre extracción de ADN y ARN | 47 |
| TALLER n.º 1: EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS | 48 |
| Contenidos a desarrollar..... | 48 |
| Plan de actividades..... | 48 |
| <i>Actividad propuesta para la práctica docente</i> | 49 |
| TRABAJO PRÁCTICO n.º 1: PROTOCOLOS DE EXTRACCIÓN DE ADN | 50 |
| I. Protocolo de extracción de ADN a partir de mucosa yugal..... | 51 |
| II. Protocolo de extracción de ADN a partir de sangre entera por el método de <i>salting out</i> | 54 |
| III. Protocolo de extracción de ADN a partir de cultivo fúngico o micelio | 57 |

| | |
|--|-----------|
| IV. Protocolo de extracción de ADN a partir de cultivo bacteriano | 59 |
| V. Protocolo de extracción de ADN a partir de muestras de tejidos vegetales..... | 62 |
| VI. Protocolo de extracción de ADN a partir de muestras embebidas en parafina | 65 |
| VII. Método de extracción de ADN a partir de biopsias..... | 68 |
| VIII. Protocolo de extracción de ADN a partir de sangre en soporte sólido (sangre seca) con tiras comerciales | 71 |
| IX. Protocolo de extracción de ADN de muestra de banana | 72 |
| <i>Reflexión para la práctica docente</i> | <i>73</i> |
| BIBLIOGRAFÍA..... | 73 |
| TALLER Y TRABAJO PRÁCTICO n.º 2: VISUALIZACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS | 75 |
| OBJETIVOS | 75 |
| FUNDAMENTO TEÓRICO DE LA ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA | 75 |
| 1. Preparación del gel de agarosa..... | 76 |
| 2. Preparación y carga de las muestras | 77 |
| 3. Corrida electroforética..... | 78 |
| 4. Visualización del ADN de las muestras | 78 |
| Factores que afectan la electroforesis | 80 |
| Ventajas..... | 82 |
| Desventajas..... | 82 |
| Electroforesis en gel de DNA plasmídico | 82 |
| Electroforesis en gel de ARN total..... | 83 |
| FUNDAMENTO DE LA EVALUACIÓN DEL ADN POR ESPECTROFOTOMETRÍA | 83 |
| TALLER No. 2: VISUALIZACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS | 86 |
| Contenidos a desarrollar..... | 86 |
| Plan de actividades..... | 86 |
| <i>Actividad propuesta para la práctica docente.</i> | <i>87</i> |
| TRABAJO PRÁCTICO n.º 2: VISUALIZACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL ADN EXTRAÍDO | 88 |

| | |
|--|-----|
| Protocolo de electroforesis en geles de agarosa | 88 |
| Protocolo del método espectrofotométrico | 90 |
| <i>Reflexión para la práctica docente</i> | 91 |
| BIBLIOGRAFÍA | 92 |
| CAPÍTULO 2. GENÓMICA | 93 |
| CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL GENOMA | 93 |
| ESTRUCTURA Y ORGANIZACIÓN DEL GENOMA PROCARIOTA | 93 |
| Revisión del modelo clásico del genoma bacteriano | 94 |
| Estructura y compactación del ADN bacteriano | 95 |
| Variabilidad genética y concepto de pangenoma | 96 |
| ORGANIZACIÓN DIFERENCIAL DEL GENOMA PROCARIOTA Y EUCARIOTA | 97 |
| GENÓMICA ESTRUCTURAL, FUNCIONAL Y COMPARATIVA | 99 |
| PROYECTO GENOMA HUMANO | 100 |
| ORGANIZACIÓN DEL GENOMA EUCARIOTA | 102 |
| Organización del genoma eucariota: ADN de copia única | 102 |
| Organización del genoma eucariota: ADN codificante y no codificante en los genes | 103 |
| Organización del genoma eucariota: ADN repetitivo | 106 |
| Organización del genoma en eucariotas: ADN repetitivo codificante | 106 |
| Organización del genoma eucariota: ADN repetitivo no codificante | 109 |
| CAPÍTULO 3. BASES MOLECULARES DE LA REPLICACIÓN | 114 |
| REPLICACIÓN DEL ADN: CARACTERÍSTICAS GENERALES | 114 |
| ENZIMOLOGÍA | 116 |
| Polimerasas | 116 |
| Requisitos para la replicación por la ADN polimerasa dirigida por ADN | 117 |
| Clasificación y funciones de las ADN polimerasas | 117 |
| Procesividad de las polimerasas y el rol del PCNA | 118 |
| Otras proteínas | 118 |
| Dinámica de la horquilla de replicación | 119 |
| Topoisomerasas | 120 |

| | |
|--|------------|
| Terminación y procesamiento de fragmentos | 120 |
| Telomerasas | 121 |
| BASES MOLECULARES DE LA MUTACIÓN Y LA REPARACIÓN DEL ADN .. | 122 |
| Concepto de mutación | 122 |
| Tipos y taxonomía de las mutaciones | 123 |
| Causas y mecanismos de mutaciones..... | 130 |
| Mecanismo de reparación | 131 |
| Transferencia e hibridación de ácidos nucleicos: desnaturalización y renaturalización del ADN..... | 134 |
| Reacción en cadena de la polimerasa: principio, etapas, variantes, usos | 136 |
| TALLER Y TRABAJO PRÁCTICO n.º 3: PCR | 137 |
| OBJETIVOS | 137 |
| FUNDAMENTO TEÓRICO DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA | 137 |
| Etapas de la PCR | 138 |
| Componentes de la PCR | 141 |
| Factores que influyen sobre la PCR | 145 |
| Problemas asociados a la PCR..... | 147 |
| Cómo evitar los falsos positivos en la PCR..... | 148 |
| Visualización de los productos de amplificación por PCR..... | 149 |
| TALLER n.º 3: PCR | 153 |
| Contenidos a desarrollar..... | 153 |
| Plan de actividades..... | 153 |
| <i>Actividad propuesta para la práctica docente</i> | 156 |
| TRABAJO PRÁCTICO n.º 3: PCR..... | 157 |
| <i>Reflexión para la práctica docente</i> | 158 |
| BIBLIOGRAFÍA..... | 159 |
| CAPÍTULO 4. BASES MOLECULARES DE LA TRANSCRIPCIÓN | 160 |
| ASPECTOS MOLECULARES DE LA TRANSCRIPCIÓN..... | 160 |
| Estructura y función de los genes | 160 |
| Diferencias entre procariontas y eucariotas | 160 |

| | |
|--|------------|
| Transcripción..... | 161 |
| Enzimología..... | 163 |
| ETAPAS DE LA TRANSCRIPCIÓN..... | 163 |
| Primera etapa de la transcripción: inicio o iniciación | 164 |
| Segunda etapa de la transcripción: elongación y maduración | 165 |
| Tercera etapa de la transcripción: terminación..... | 168 |
| Transporte al citoplasma..... | 168 |
| CONTROL DE LA EXPRESIÓN GÉNICA..... | 168 |
| CONTROL DE LA EXPRESIÓN GÉNICA EN PROCARIOTAS | 169 |
| Regulación de la expresión génica por inducción por sustrato..... | 169 |
| Regulación de la expresión génica por represión por producto..... | 171 |
| CONTROL DE LA EXPRESIÓN GÉNICA EN EUCARIOTAS..... | 173 |
| Puntos de control durante el flujo de la información génica..... | 173 |
| CONTROL DE LA EXPRESIÓN GÉNICA PRETRANSCRIPCIONAL | 174 |
| CONTROL DE LA EXPRESIÓN GÉNICA TRANSCRIPCIONAL | 174 |
| Control de la expresión génica transcripcional: elementos <i>cis</i> | 174 |
| Tipos de promotores | 175 |
| Control de la expresión génica transcripcional: elementos <i>trans</i> | 177 |
| Motivos estructurales responsables de la interacción con el ADN | 177 |
| Mecanismo de acción de los factores de transcripción | 179 |
| Análisis comparativo entre los genes de expresión basal y regulada..... | 180 |
| Factores de transcripción inducibles | 181 |
| Receptores de hormonas esteroideas | 182 |
| Receptor del interferón gamma | 183 |
| CONTROL DE LA EXPRESIÓN GÉNICA POSTTRANSCRIPCIONAL | 184 |
| Maduración y procesamiento del pre-ARNm: características | 184 |
| Control del procesamiento del ARN: <i>splicing</i> alternativo..... | 184 |
| Control del procesamiento del ARN: edición del ARN | 185 |
| Control de la estabilidad del ARN..... | 186 |
| Control del transporte del ARN..... | 187 |
| Regulación postranscripcional: silenciamiento génico en plantas | 187 |

| | |
|--|------------|
| BIBLIOGRAFÍA..... | 188 |
| CAPÍTULO 5. BASES MOLECULARES DE LA TRADUCCIÓN | 189 |
| CÓDIGO GENÉTICO | 189 |
| Propiedades del código genético | 189 |
| ASPECTOS MOLECULARES DE LA TRADUCCIÓN | 191 |
| Características generales de la traducción..... | 191 |
| Estructura de los ribosomas | 192 |
| Estructura de los ARNt..... | 192 |
| ETAPAS DE LA TRADUCCIÓN | 193 |
| Activación de los aminoácidos (formación de aminoacil-ARNt) | 193 |
| Iniciación de la traducción | 195 |
| Elongación de la traducción | 197 |
| Terminación de la traducción | 199 |
| POLIRRIBOSOMAS Y SÍNTESIS SIMULTÁNEA DE PROTEÍNAS..... | 199 |
| MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES..... | 200 |
| Procesamiento del polipéptido..... | 200 |
| Plegamiento y conformación molecular..... | 200 |
| Tráfico y direccionamiento celular o <i>protein sorting</i> | 201 |
| Ciclo de vida y degradación proteica..... | 207 |
| REGULACIÓN DE LA TRADUCCIÓN | 209 |
| MÉTODOS MOLECULARES PARA EL ESTUDIO DE PROTEÍNAS..... | 211 |
| TALLER Y TRABAJO PRÁCTICO n.º 4: ANÁLISIS DE PROTEÍNAS | 212 |
| OBJETIVOS | 212 |
| FUNDAMENTO TEÓRICO DE LA EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS..... | 213 |
| FUNDAMENTO TEÓRICO DE LA CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES POR EL MÉTODO DE BRADFORD | 214 |
| FUNDAMENTO TEÓRICO DE LA ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)..... | 216 |
| Separación molecular por electroforesis | 218 |
| Proceso de SDS-PAGE: realización del gel de poliacrilamida..... | 218 |
| Proceso de SDS-PAGE: tratamiento de las muestras antes de su siembra | 220 |

| | |
|--|------------|
| Proceso de SDS-PAGE: corrida electroforética | 221 |
| Equipo electroforético | 222 |
| Proceso de SDS-PAGE: fijación y tinción de proteínas en geles de poliacrilamida | 223 |
| Proceso de SDS-PAGE: interpretación de resultados mediante el cálculo del Rf.. | 224 |
| Consideraciones de seguridad al trabajar con poliacrilamida | 225 |
| FUNDAMENTO TEÓRICO DEL WESTERN BLOT | 226 |
| Etapas de Western blot: separación electroforética de las proteínas | 226 |
| Etapas de Western blot: transferencia a membrana | 226 |
| Etapas de Western blot: bloqueo de sitios inespecíficos..... | 227 |
| Etapas de Western blot: incubación con el anticuerpo primario..... | 228 |
| Etapas de Western blot: incubación con el anticuerpo secundario | 229 |
| Etapas de Western blot: detección | 230 |
| TALLER n.º 4: ANÁLISIS DE PROTEÍNAS..... | 232 |
| Contenidos a desarrollar..... | 232 |
| Plan de actividades: método de Bradford | 232 |
| Plan de actividades: electroforesis en geles de poliacrilamida..... | 233 |
| Plan de actividades: Western blot | 236 |
| <i>Actividad propuesta para la práctica docente.</i> | <i>237</i> |
| TRABAJO PRÁCTICO n.º 4: ANÁLISIS DE PROTEÍNAS | 238 |
| Cuantificación de proteínas por el método de Bradford..... | 238 |
| SDS-PAGE | 239 |
| <i>Reflexión para la práctica docente</i> | <i>243</i> |
| BIBLIOGRAFÍA..... | 244 |
| UNIDAD 6. BASES MOLECULARES DEL CICLO CELULAR..... | 245 |
| CICLO CELULAR..... | 245 |
| Etapas del ciclo celular | 245 |
| Mitosis..... | 246 |
| Reproducción sexual..... | 247 |
| Meiosis | 248 |
| SEÑALIZACIÓN CELULAR | 250 |

| | |
|---|------------|
| Señalización celular y transducción de señales | 251 |
| Clasificación de receptores y mecanismo de acción | 251 |
| Naturaleza de la respuesta celular | 252 |
| Tipo de respuesta celular | 252 |
| CONTROL DEL CICLO CELULAR..... | 253 |
| Puntos de control del ciclo celular..... | 253 |
| Ciclinas y quinasas dependientes de ciclinas | 254 |
| Clasificación y secuencialidad de los complejos Cdk-ciclinas | 255 |
| Mecanismo de regulación del ciclo celular | 257 |
| Papel de la p53 | 258 |
| Muerte celular: apoptosis y necrosis | 259 |
| BIBLIOGRAFÍA | 261 |
| UNIDAD 7. APLICACIONES DE LA BIOLOGÍA MOLECULAR | 262 |
| LA BIOTECNOLOGÍA Y LAS HERRAMIENTAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR | 262 |
| Tecnología del ADN recombinante y enzimas de restricción | 262 |
| Vectores de clonación y expresión | 262 |
| Etapas de la clonación | 263 |
| Métodos de transformación en sistemas biológicos..... | 264 |
| Organismos genéticamente modificados | 264 |
| Construcción de genotecas | 264 |
| Terapias génicas | 265 |
| Consideraciones jurídicas, legales y bioéticas | 265 |
| MARCADORES MOLECULARES..... | 265 |
| Polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción (RFLP)..... | 268 |
| PCR-RFLP | 270 |
| ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD) | 271 |
| Polimorfismo de simple nucleótido (NSP)..... | 272 |
| Minisatélites (VNTR) y microsatélites (SSR o STR) | 272 |
| HERRAMIENTAS BIOINFORMÁTICAS..... | 276 |
| Introducción a la Bioinformática | 277 |

| | |
|--|------------|
| BASES DE DATOS Y REPOSITARIOS BIOINFORMÁTICOS INTEGRALES ... | 281 |
| Introducción al NCBI | 281 |
| Fundamento teórico del uso del NCBI..... | 281 |
| La biblioteca científica de NCBI: PubMed | 283 |
| Herramientas de alineamiento para la comparación de secuencias..... | 284 |
| La herramienta bioinformática más usada del NCBI: BLAST | 285 |
| BASES DE DATOS, REPOSITARIOS, PROGRAMAS BIOINFORMÁTICOS DE NUCLEÓTIDOS Y RELACIONADOS | 288 |
| La base de datos de secuencias genéticas del NCBI: GenBank | 288 |
| Introducción a Ensembl..... | 289 |
| Fundamento teórico del uso de Ensembl | 289 |
| Introducción al DDBJ..... | 290 |
| Introducción a Primer3 | 290 |
| Introducción a NEBcutter | 292 |
| BASES DE DATOS, SERVIDORES Y RECURSOS DE PROTEÍNAS | 292 |
| Introducción a ExpASY..... | 292 |
| Introducción a UniProt..... | 292 |
| Fundamento teórico del uso de UniProt | 293 |
| <i>Protein Data Bank</i> | 293 |
| Introducción a InterPro | 294 |
| Fundamento teórico del uso de InterPro | 294 |
| Introducción a Pfam..... | 294 |
| Fundamento teórico del uso de Pfam | 294 |
| Introducción a Rasmol..... | 295 |
| Introducción a GOR..... | 296 |
| Introducción a AlphaFold | 296 |
| Fundamento teórico del uso de AlphaFold..... | 296 |
| TALLER n.º 5: APLICACIÓN DE MARCADORES MOLECULARES | 297 |
| OBJETIVOS | 297 |
| Plan de actividades..... | 297 |
| <i>Actividad propuesta para la práctica docente.</i> | 303 |

| | |
|--|-----|
| BIBLIOGRAFÍA | 304 |
| TALLER n.º 6: BIOINFORMÁTICA | 305 |
| OBJETIVOS | 305 |
| Plan de actividades | 306 |
| <i>Actividad propuesta para la práctica docente.</i> | 308 |
| BIBLIOGRAFÍA | 309 |
| ANEXOS | 311 |
| ANEXO 1.1. FICHAS DE SEGURIDAD DE LOS REACTIVOS QUÍMICOS USADOS EN LOS TRABAJOS PRÁCTICOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR. | 311 |
| ANEXO 1.2. PROTOCOLOS DE EXTRACCIÓN DE ARN A PARTIR DE SANGRE. | 315 |
| Protocolo convencional de extracción de ARN total a partir de sangre entera | 315 |
| Protocolo de extracción de ARN total a partir de sangre entera utilizando un <i>kit</i> comercial | 317 |
| ANEXO 1.3. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES MADRE PARA EXTRACCIÓN DE ADN | 319 |

PREFACIO

«La educación es el arma más poderosa que puedes usar para cambiar el mundo»

Nelson Mandela (1918-2013)

La Biología Molecular nos abre la puerta al conocimiento más íntimo de la vida. Este cuaderno está pensado para futuros docentes de Biología, como una herramienta académica y a la vez inspiradora, que los acompañe en la construcción de saberes sólidos y en la tarea de transmitir a sus estudiantes la maravilla de comprender la vida desde sus bases moleculares.

Este cuaderno ha sido elaborado pensando en los estudiantes con un sólido recorrido universitario y llegan al laboratorio de Biología Molecular con curiosidad y expectativas. También lo concebimos como un recurso que acompañe su crecimiento a lo largo de la carrera, ofreciendo fundamentos firmes sobre los cuales construir nuevos saberes. Al mismo tiempo, reconocemos nuestro rol en la formación de futuros profesores, colegas que tendrán un impacto en los entornos educativos en los que se desempeñen. Por ello, buscamos que este material aporte contenidos de Biología Molecular e invite al análisis y a la reflexión, como prácticas esenciales para comprender y orientar los cambios en el ámbito científico y educativo.

Es por ello que proponemos este cuaderno de estudio que abarca las unidades del programa de Biología Molecular del Profesorado Universitario en Biología. Cada unidad se desarrolla en dos partes complementarias, una parte teórica y una práctica. En la parte teórica se abordan los conceptos básicos mínimos para la comprensión de la asignatura y de los trabajos prácticos (talleres y laboratorios). Como equipo docente valoramos profundamente el aprendizaje que se genera en el laboratorio: un espacio clave para asimilar conceptos, desarrollar habilidades prácticas y fomentar el trabajo en equipo. Para ello, cada trabajo práctico (TP) se inicia con una actividad de taller orientada a trabajar los fundamentos teóricos y conceptuales necesarios, de modo que los estudiantes lleguen al laboratorio con las bases ya incorporadas, lo que favorece un ambiente de aprendizaje colaborativo y de debate. El laboratorio constituye un espacio clave para asimilar conceptos, desarrollar habilidades prácticas y fomentar el trabajo en equipo. Cada TP presenta objetivos claros, una introducción teórica y una serie de procedimientos acompañados de actividades que integran temas de Biología Molecular. Las propuestas experimentales diseñadas favorecen el desenvolvimiento en el laboratorio y la interpretación de resultados, así como instancias de resolución de ejercicios, situaciones problemáticas y preguntas para reflexionar y discutir, con el fin de afianzar los conceptos de manera integrada. Al final de cada práctica encontrarán un apartado denominado *«En perspectiva docente»*, que

ofrece actividades específicas para enriquecer la formación pedagógica mediante la construcción y revisión de prácticas de enseñanza.

Deseamos que el laboratorio de Biología Molecular sea un ámbito de aprendizaje compartido, donde el conocimiento se construya de manera colectiva y que esta guía de trabajos prácticos sea una herramienta para descubrir y disfrutar la riqueza de esta disciplina. Para nosotras, es un privilegio acompañarlos en esta etapa culminante de su formación académica.

*Equipo docente de la
Cátedra de Biología Molecular*

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN A LA BIOLOGÍA MOLECULAR

La Biología Molecular surge como un nuevo enfoque de la Biología que integra los conocimientos de la Bioquímica, la Biología Celular y la Genética para explicar los procesos biológicos. El conocimiento se fue construyendo a lo largo de los años, con aportes de distintos investigadores, hasta llegar a esta área, donde se estudian los procesos que se llevan a cabo en los seres vivos desde el punto de vista molecular.

CONCEPTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

El conocimiento de la estructura de los ácidos nucleicos se inició en el siglo XIX con el aislamiento de una nucleína en el núcleo celular, formada por una parte ácida (ADN) y una parte básica (proteína). También se conocieron las propiedades parciales de la nucleína y su relación con la herencia celular. Sin embargo, la estructura sólo se conoció a mediados del siglo XX, al mostrar que el ADN era el componente cromosómico depositario de la información genética. Los experimentos de Avery, MacLeod y McCarty en 1944 y de Hershey-Chase en 1952 constituyen un hito en el conocimiento del material genético a escala molecular. Tras estas aportaciones iniciales, el verdadero inicio de la Biología Molecular moderna lo constituyó la propuesta de la doble hélice del ADN por Watson y Crick en 1953.

FUNDAMENTOS MOLECULARES Y CELULARES DE LA HERENCIA: RELACIÓN ENTRE LA GENÉTICA MOLECULAR Y MENDELIANA

Aunque el descubrimiento de la estructura del ADN permitió comprender la base molecular de la información genética, el estudio de la herencia comenzó varias décadas antes con los trabajos de Gregor Mendel, cuyos experimentos establecieron los principios fundamentales de la transmisión de los caracteres hereditarios. Estos principios constituyen el punto de partida de la genética clásica y permiten comprender conceptos como genotipo, fenotipo y alelos, que posteriormente encontrarían su explicación molecular en la estructura y función del ADN.

Leyes de Mendel

La historia de la genética moderna se inicia con los trabajos de Gregor Mendel (1822–1884), monje agustino y naturalista cuya labor experimental, desarrollada en el monasterio de

Brno a mediados del siglo XIX, estableció los principios fundamentales de la herencia biológica. Sus resultados fueron publicados en 1866 en la obra *Experimentos sobre hibridación de plantas*, aunque no fueron plenamente reconocidos por la comunidad científica hasta su redescubrimiento en 1900. Aunque Mendel desconocía la naturaleza molecular del material hereditario, su modelo postuló la existencia de unidades discretas de herencia (los actuales genes) y estableció un marco matemático para comprender la transmisión de los caracteres. Su obra sentó las bases de la genética clásica y, posteriormente, de la genética molecular y la genómica contemporánea.

Mendel seleccionó como organismo modelo la planta de arveja, *Pisum sativum*, debido a varias ventajas metodológicas. Son de fácil cultivo y ciclo de vida relativamente corto; producen abundante descendencia y existen variedades puras con caracteres contrastantes. Además, la flor del *P. sativum* es una planta que puede autopolinizarse porque tiene los óvulos y las anteras en la misma flor, recubiertos por pétalos, lo que hace difícil que sea polinizada por otra planta. También, permitió que Mendel controlara manualmente su polinización y realizara polinizaciones cruzadas.

Estudió siete caracteres discretos y fácilmente distinguibles, como el color y la forma de las semillas, el color de las flores y la longitud del tallo. Cada carácter presentaba dos variantes claramente diferenciadas. Por ejemplo, la superficie de la semilla, si era lisa o rugosa o el color de las semillas, amarilla o verde.

En primera instancia, Mendel realizó cruzamientos controlados entre líneas puras (homocigotas) que diferían en un solo carácter (cruzamientos monohíbridos). Tras obtener la primera generación filial (F1), observó que solo uno de los rasgos parentales se manifestaba. En la segunda generación (F2), el carácter “desaparecido” reaparecía con una proporción aproximada de 3:1. Luego, efectuó cruzamientos dihíbridos, analizando simultáneamente dos caracteres, lo que le permitió evaluar cómo se transmitían de manera conjunta.

A partir del análisis cuantitativo de sus resultados, Mendel formuló tres principios fundamentales:

1. Ley de la uniformidad: al cruzar dos líneas puras que difieren en un carácter, toda la descendencia F1 es fenotípicamente uniforme, es decir, los descendientes eran iguales entre sí y a uno de sus progenitores. A las variantes que aparecían en la F1 las llamó dominantes. Ejemplo de cruzamiento: en el caso del modelo de estudio de Mendel, es un organismo diploide por lo que tiene dos juegos de cromosomas, uno que vino de la

madre y otro que vino del padre (establezcamos AA para el carácter amarillo y aa para el carácter verde). Mendel postuló que las variantes que aparecían en la F1 (amarillas) se llamaban dominantes porque no veía que aparecieran las verdes (**Figura 1.1**).

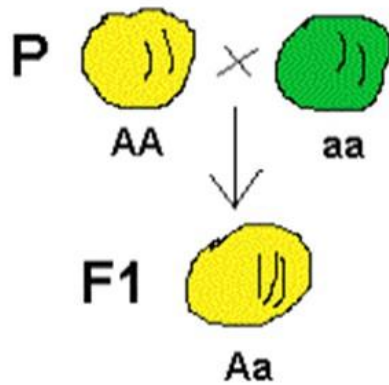


Figura 1.1. Experimento que permitió establecer la primera ley de Mendel, la ley de la uniformidad.

Para responder a lo que sucedió con esa otra variante (verde), dejó que las plantas de la F1 se autopolinicen y observó que los caracteres recesivos, al cruzar dos razas puras, quedan ocultos en la primera generación. Sin embargo, reaparecen en la segunda en una proporción de 1 a 3 respecto a los caracteres dominantes. Podemos ver en el Tablero de Punnett los tipos de gametas que tiene el individuo Aa, el entrecruzamiento entre dos individuos Aa y en cada una de las celdas, el resultado de esos cruzamientos (AA, Aa, aA y aa) (**Figura 1.2**). Cuando “a” se une con “a”, aparece el verde, entonces contaba tres amarillas y una verde. De esta manera, se establece la segunda ley de Mendel:

2. Ley de la segregación: los “factores hereditarios” (hoy denominados genes) existen en pares y se separan durante la formación de gametos, de modo que cada gameto recibe solo uno de los dos alelos.

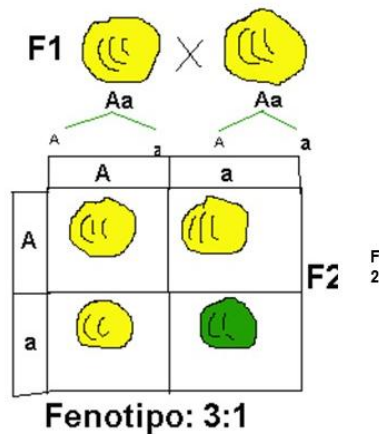


Figura 1.2. Experimento que permitió establecer la segunda ley de Mendel, la ley de la segregación.

3. Ley de la distribución independiente: los pares de factores correspondientes a distintos caracteres se segregan de manera independiente durante la formación de gametos (válida para genes no ligados). Establece que los caracteres son independientes y se combinan al azar. Es decir, que cuando se forman los gametos los alelos de un gen segregan independientemente de los alelos del gen para otra característica (**Figura 1.3**).

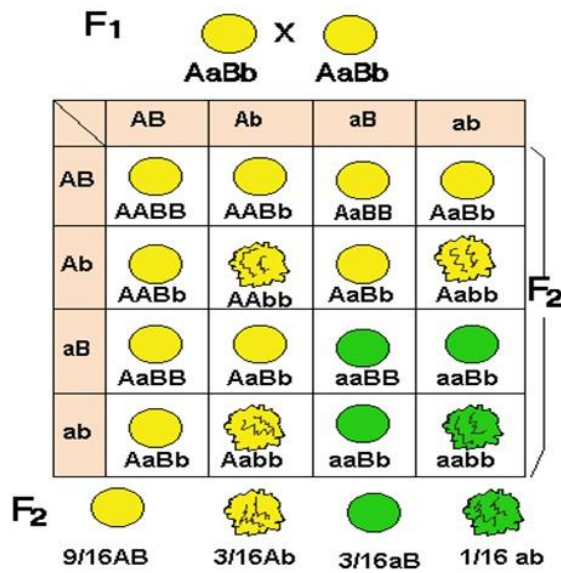


Figura 1.3. Experimento que permitió establecer la tercera ley de Mendel, la ley de la distribución independiente.

Genotipo y fenotipo

Las leyes propuestas por Mendel proporcionan el marco conceptual que permite comprender la relación entre genotipo y fenotipo, así como la naturaleza de los genes y sus variantes, los alelos.

El genotipo representa la constitución genética de un individuo para uno o varios loci, es decir, la combinación específica de alelos que posee. Continuando con el ejemplo anterior, cuando hablamos de Aa o AaBb, estamos hablando del genotipo. El fenotipo, en cambio, corresponde a la manifestación observable de ese genotipo, resultado de la interacción entre la información genética y el ambiente. Cuando decimos amarillo o verde, estamos hablando del fenotipo.

La ley de la segregación explica que los dos alelos que componen el genotipo para un carácter se separan durante la formación de gametos, de modo que cada descendiente recibe uno de cada progenitor. La ley de la distribución independiente fundamenta cómo distintos genes pueden heredarse sin influenciarse mutuamente cuando no están ligados.

De este modo, las leyes mendelianas establecen la base para interpretar cómo la combinación de alelos (genotipo) determina la expresión de un carácter (fenotipo), articulando la genética clásica con la comprensión molecular actual de la herencia.

El gen es una secuencia de ADN que codifica un producto funcional, ya sea una proteína o un ARN. En el flujo de la información genética, la información está en el ADN y pasa a un ARNm y luego a una proteína; entonces el producto final es la proteína y en el caso del ARNt o el ribosomal, el producto es el ARN. Un gen es aquella región de ADN que comprende las secuencias estructurales, que se transcriben a ARN, y las secuencias reguladoras que actúan controlando la transcripción de las regiones estructurales.

Un alelo es una secuencia de ADN que se sitúa en un locus y un locus es una posición definida, que es ocupada por esa secuencia en ambos cromosomas homólogos. Este alelo puede ser un gen, hay secuencias de ADN que no son genes, pero que pueden ser alelos. Cuando hablamos de loci, hablamos de varias posiciones para genes diferentes en un mismo par de cromosomas. Entonces, cada par de alelos ocupa el mismo locus (un alelo heredado del padre y el otro de la madre) (**Figura 1.4**).

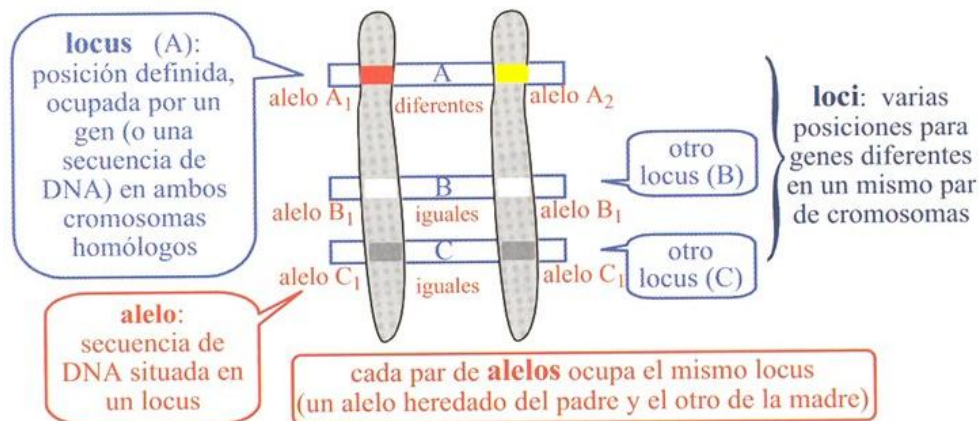


Figura 1.4. Alelos y loci de dos cromosomas homólogos.

Alelismo múltiple y organismo diploide

El conjunto de genes o alelos pertenecientes a un mismo locus constituye una serie alélica y al fenómeno se lo denomina alelismo múltiple. El genotipo de un individuo diploide sólo puede tener 2 dosis genéticas, aunque puedan tener más de 2 alternativas genéticas. Es decir, los seres humanos somos organismos diploides, tenemos dos variantes para una posición en particular (una que vino de la madre y otra que vino del padre). Sin embargo, en la población pueden existir más variantes, pero cada persona tendrá dos.

Un organismo diploide puede ser homocigoto o heterocigoto, homocigoto cuando los dos alelos son iguales y heterocigoto cuando los dos alelos son diferentes. Continuando con el ejemplo anterior, homocigotos AA y heterocigotos Aa.

ESTRUCTURA DE LOS ÁCIDOS NUCLEICOS

Los ácidos nucleicos presentan estructura primaria, secundaria y de orden superior.

- Estructura primaria: polímero de nucleótidos. Está formado por la unión de nucleótidos monofosforilados mediante enlaces fosfodiéster dando un polímero lineal.

- Estructura secundaria: organización espacial de las unidades poliméricas. Se refiere al análisis espacial de la molécula. El ADN está definido por la unión de dos cadenas de nucleótidos a través de sus bases. En el ARN se presenta en determinadas regiones mediante uniones intercatenarias entre bases complementarias.

- Estructura de orden superior: organización tridimensional dentro de la célula. Se refiere a la estructura tridimensional, en el ADN está representada por el superenrollamiento y en el ARN (específicamente los ARNt) es un plegamiento tridimensional definido.

Estructura del nucleótido

Un nucleótido es la unidad estructural y funcional básica de los ácidos nucleicos y está constituido por tres componentes químicos covalentemente asociados:

1. Una base nitrogenada heterocíclica, que puede ser de tipo purínico: adenina (A) y guanina (G) o pirimidínico: citosina (C), timina (T) y uracilo (U). La base se une al carbono 1' del azúcar mediante un enlace N-glucosídico β .
2. Un azúcar pentosa, que puede ser β -D-ribosa (en ribonucleótidos del ARN) o β -D-2-desoxirribosa (en desoxirribonucleótidos del ADN). La diferencia estructural clave radica en la presencia (ARN) o ausencia (ADN) de un grupo hidroxilo en el carbono 2', lo cual influye en la estabilidad química y conformación del polímero. La conformación de las bases con relación a la pentosa es anti porque con esta conformación se exponen los átomos electronegativos que formarán el puente de hidrógeno con las bases nitrogenadas de la otra hebra en el ADN.
3. Uno o más grupos fosfato esterificados generalmente al carbono 5' de la pentosa mediante un enlace fosfoéster. Cuando los nucleótidos se incorporan a una cadena polinucleotídica, los grupos fosfato median la formación de enlaces fosfodiéster 3'-5', que conectan el grupo hidroxilo 3' de un nucleótido con el fosfato 5' del siguiente, generando el esqueleto azúcar-fosfato característico de los ácidos nucleicos.

Estructura primaria del ADN

En cuanto al número de hebras, el ADN está formado por 2 hebras que son los polímeros lineales de nucleótidos; mientras que el ARN tiene una sola hebra (**Figura 1.5**). Respecto con las bases, el ADN está formado por adenina, timina, guanina y citosina; en el ARN no hay timina sino un uracilo (uracilo, adenina, citosina y guanina). Con relación a las pentosas, el ARN tiene como pentosa siempre una ribosa; mientras que, en el ADN, el ácido desoxirribonucleico es una desoxirribosa, su C2' está reducido.

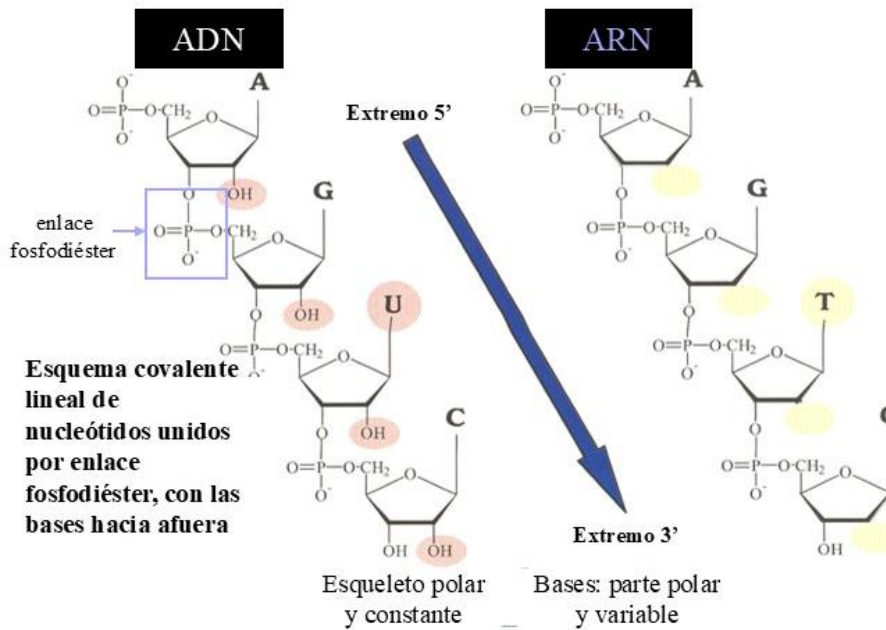


Figura 1.5. Estructura primaria de los ácidos nucleicos.

El enlace fosfodiéster es el vínculo covalente que une los nucleótidos en los ácidos nucleicos y constituye el eje estructural continuo de la molécula. Se establece entre el grupo hidroxilo del carbono 3' de una pentosa (ribosa o desoxirribosa) y el grupo fosfato unido al carbono 5' del nucleótido siguiente. Desde el punto de vista químico, el fosfato forma dos enlaces éster simultáneos, de allí la denominación diéster, conectando dos azúcares consecutivos mediante un puente fosfato. La formación de este enlace ocurre durante la polimerización catalizada por las ADN o ARN polimerasas, a partir de nucleósidos trifosfato, entre el fosfato del C5' y el oxidrilo del C3'. El mecanismo implica el ataque nucleofílico del grupo 3'-OH al fósforo α del nucleótido entrante, con liberación de pirofosfato (PPi), cuya hidrólisis posterior impulsa termodinámicamente la reacción hacia la síntesis del polímero.

Estructura secundaria del ADN – Modelo de Watson y Crick

Diferentes investigadores avanzaron sobre la estructura del ADN, pero fueron Watson y Crick en 1953 quienes usaron toda esa información y presentaron el modelo del B-ADN. Se basaron en estudios de difracción de rayos X del ADN que indicaron que la molécula es helicoidal y que tiene una doble periodicidad a lo largo del eje de la hélice (**Figura 1.6**).

Chargaff observó que la proporción de las cuatro bases de los nucleótidos en diferentes organismos es prácticamente igual a 1; es decir, que hay igual cantidad de adenina que timina

y guanina que citosina. Con eso, comprendieron que, en la molécula del ADN, siempre hay una adenina frente a una timina y frente a una guanina, una citosina.

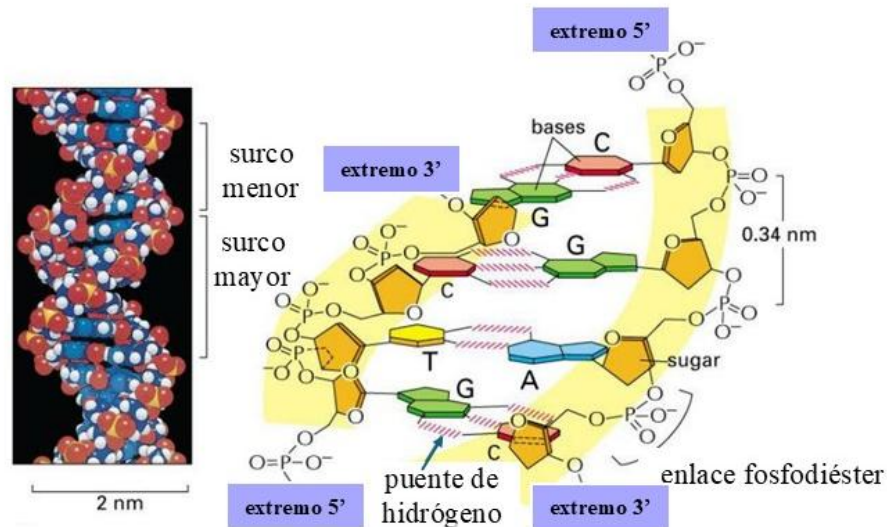


Figura 1.6. Estructura secundaria del B-ADN. Tomado de The Cell, 4ta edición con modificaciones.

Propiedades del B-ADN

Complementariedad: existe complementariedad entre las bases, frente a una adenina, una timina y frente a una guanina, una citosina. Las bases púricas (adenina y guanina) están formadas por dos anillos, mientras que las pirimidínicas (citosina, timina y uracilo) por uno solo. Esto hace que la distancia entre las hebras del ADN sea constante a lo largo de toda la molécula y eso sólo es posible si frente a una purina hay una pirimidina.

Antiparalelismo: para que sea posible el apareamiento entre las dos hebras deben disponerse en sentidos opuestos, una avanza de 5' a 3' y la otra debe hacerlo de 3' a 5'. Por eso, se dice que son antiparalelas.

Helicidad: la complementariedad de las bases justifica tanto el antiparalelismo como la helicidad. Las restricciones estéricas que se producen hacen que el apareamiento completo de las dos hebras solo se puede realizar si los pares de bases sucesivos van girando unos con respecto a otros y como consecuencia adoptan una disposición helicoidal, que se enrollan alrededor de un eje común formando una doble hélice dextrógira.

Carácter anfipático del ADN: se refiere a que el ADN tiene carácter hidrofílico en el exterior e hidrofóbico en el interior. El carácter hidrofílico está dado por el esqueleto azúcar-fosfato, que está hacia el exterior de la cadena, los grupos fosfato al pH del organismo se

encuentran ionizados, se dice que el ADN es una cadena polianiónica. El carácter hidrofóbico se da en el interior de donde hay un apilamiento de bases; cuando la cadena de ADN se va enrollando sobre sí misma en doble hélice, las bases se apilan y le da un carácter hidrofóbico en el interior.

Fuerzas que estabilizan el B-ADN: hay tres fuerzas que estabilizan el modelo B-ADN de Watson y Crick. Estas son las fuerzas hidrofílicas, que están hacia afuera (los esqueletos pentosas-fosfatos). Las fuerzas hidrofóbicas, son las de apilamiento de las bases que generan una fuerza de Van der Waals entre ellas en el interior de la molécula. Y los puentes hidrógenos entre las bases de las diferentes hebras.

Surcos en el B-ADN: como consecuencia de las propiedades del B-ADN se forman dos surcos a lo largo de la estructura en doble hélice, el surco mayor donde se exponen las bases y el surco menor (**Figura 1.6**). El surco mayor es el que tiene más importancia debido a que deja espacio suficiente para que moléculas externas puedan contactar con las bases. Por ejemplo, las proteínas “leen” la secuencia a través de los grupos funcionales de las bases que asoman dentro del surco mayor del ADN.

Medidas del B-ADN:

- Diámetro constante: 2,7 nm
- Doble periodicidad: 10,4 pares de bases (pb)/vuelta
- Bases perpendiculares al eje: 88,8°
- Hélice dextrógira: 34,6° por base.
- Paso: 3,54 nm/vuelta - 0,4 nm/pb.

Propiedades de los ácidos nucleicos en disolución

Hidrofilia: las cadenas de ADN y ARN son hidrofílicas, debido a la posibilidad que tienen de formar enlaces hidrógenos con el agua por parte del grupo fosfato y oxhidrilo libre de las pentosas a lo largo de todo el esqueleto.

Comportamiento ácido: tienen comportamiento ácido, a pH fisiológico los grupos fosfatos se ionizan casi por completo, haciendo que las moléculas de ADN y ARN se comporten como ácidos y tengan numerosas cargas negativas. Esto le otorga el carácter de ser una molécula polianiónica.

Absorbancia de luz UV: absorben luz UV, ello se da por la presencia de los anillos aromáticos en las bases que absorben a 260 nm.

Viscosidad: debido a la relativa rigidez de la molécula en doble hélice y a su gran longitud con relación al diámetro, las soluciones de ADN son muy viscosas y esta propiedad tiene interés en la desnaturalización.

Desnaturalización: la temperatura tiene relación directa con el proceso de desnaturalización del ADN. A medida que aumenta la temperatura se puede producir la separación de las hebras, que es lo que se denomina desnaturalización.

Reactividad: el ARN es más reactivo porque en el C2' tiene un grupo oxidrilo y esto lo hace más vulnerable a un ataque alcalino.

Consecuencias biológicas del modelo del B-ADN

El material genético es capaz de almacenar la información genética de un individuo. Además, el material genético es sensible a mutaciones, pero al disponer de la hebra complementaria, permite su reparación.

Por otra parte, el material genético es replicado con precisión.

El material genético es expresado como un fenotipo.

Variaciones de la estructura secundaria del ADN: forma Z y forma A del ADN

Además de la forma B-ADN de Watson y Crick, hay alomorfos del ADN como el A-ADN y el Z-ADN (**Figura 1.7**). Las conformaciones A, B y Z del ADN representan variantes estructurales de la doble hélice que difieren en su geometría helicoidal, condiciones de estabilidad y disposición espacial de bases y azúcares. Aunque comparten el mismo principio de complementariedad de bases, presentan diferencias relevantes desde el punto de vista fisicoquímico y funcional.

El A-ADN que es el B-ADN, pero deshidratado; es decir, no es el que tenemos en nuestro organismo. Presenta hélice dextrógira al igual que el B-ADN, pero tiene aproximadamente 11 pb por vuelta. Es más compacta, tiene una menor longitud por vuelta. El surco mayor es más profundo y estrecho; y el surco menor es más ancho y superficial. Las bases nitrogenadas se encuentran inclinadas respecto del eje helicoidal.

El Z-ADN es una conformación alternativa menos frecuente. Presenta hélice levógira y aproximadamente 12 pb por vuelta. El esqueleto tiene disposición en zigzag (de allí su nombre). Su surco mayor es poco definido y el surco menor es estrecho y profundo. Se favorece en secuencias ricas en GC y en condiciones de alta concentración salina. El Z-ADN hace referencia a regiones del B-ADN que están formadas por 6 nucleótidos (CGCGCG), donde hay estas regiones, el giro de la hélice no es dextrógiro sino levógiro. El ADN Z puede aparecer

transitoriamente en regiones reguladoras y se ha vinculado con procesos de regulación génica y tensión torsional.

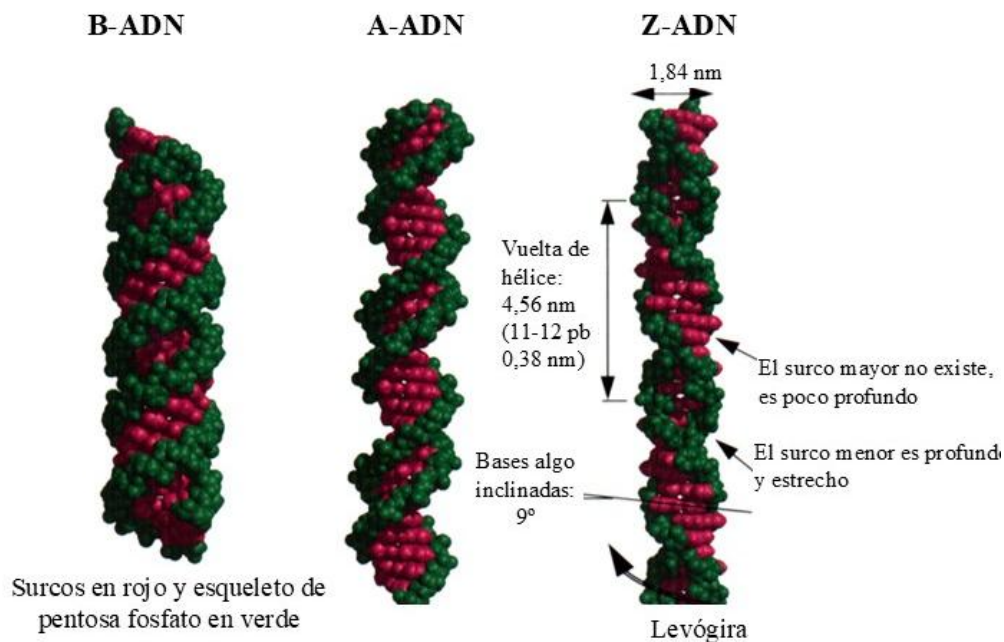


Figura 1.7. Alomorfos del ADN. Modelos espaciales compactos. Tomado de Harcourt, 2000 con modificaciones.

Estructura de orden superior del ARN

- ARN de transferencia (ARNt): los ARNt forman una estructura de orden superior.
- ARN ribosómico (ARNr): los ARNr en algunos casos pueden asociarse a otras proteínas y adoptar la estructura de orden superior.

Se conocen varios tipos distintos y están presentes en los ribosomas, orgánulos intracelulares implicados en la síntesis de proteínas. Su estructura secundaria y terciaria presenta un plegamiento complejo que le permite asociarse tanto a las proteínas integrales de los ribosomas como a otros ARN y participar en el proceso de síntesis proteica.

Estructuras de orden superior del ADN

Para adoptar una estructura de orden superior, el ADN sufre lo que se llama condensación, que abarca su superenrollamiento y empaquetamiento. El superenrollamiento tiene gran significado porque permite entender cómo un ADN que es de gran magnitud puede alojarse en el núcleo de las células que tiene dimensiones mucho menores que las que tiene un ADN. Por

ejemplo, un cromosoma humano tiene una longitud de 17-85 mm, mientras que cuando se compacta y se condensa queda de 4-6 μm .

Se entiende por superenrollamiento (enrollar algo que ya está enrollado) del ADN al retorcimiento o giro sobre sí mismo (que ya está enrollado); quiere decir que las dos hebras del ADN sufren enrollamiento mientras que la doble hélice sufre superenrollamiento.

Como se mencionó anteriormente, la condensación del ADN se rige también por el empaquetamiento además del superenrollamiento. El empaquetamiento de la molécula de ADN ocurre cuando esta se asocia a proteínas, las histonas y las proteínas no histónicas. El superenrollamiento causa tensión estructural en la molécula, la cual es modulada por la acción de topoisomerasas. Existen dos tipos de isomerasas, la topoisomerasa de tipo 1 que escinde, rompe, corta transitoriamente una hebra de ADN; mientras que las topoisomerasas de tipo 2 cortan las dos hebras.

Las histonas (H1, H2a, H2b, H3 y H4) son las principales proteínas componentes del material genético en eucariotas y su función es estabilizar la estructura del ADN, contribuyendo a compactarla, para facilitar su empaquetamiento. Estructuralmente, las histonas constituyen una familia de proteínas semejantes, de tamaño relativamente pequeño y con elevado contenido de aminoácidos básicos. Gracias a ello, muestran naturaleza policatiónica a pH fisiológico (numerosas cargas positivas en cada molécula) y se asocian fuertemente, mediante interacciones electrostáticas, con los grupos fosfato del esqueleto del ADN (estos grupos fosfato están ionizados, o sea que tienen carga negativa). El grado de la condensación de la molécula de ADN se regula por acetilación y fosforilación de las histonas, afectando así a la accesibilidad del ADN para la transcripción. De este modo las histonas intervienen en el control de la expresión génica.

Las proteínas no histónicas (protaminas, HMG, esqueleto) también son importantes porque algunas, por ejemplo, son proteínas que forman un esqueleto donde se va a ir enrollando y superenrollado el ADN. Hay muchas proteínas no histónicas que no tienen una función estructural que actuarán en la replicación, en la transcripción, en la regulación del grado de condensación de la cromatina.

Niveles de condensación del ADN

Se puede estudiar la condensación del ADN en niveles (**Figura 1.8**). El nucleosoma es la unidad básica de la cromatina que se llama fibra de 10 nm porque es el grosor o el diámetro de esta estructura. Está formado por 9 moléculas de histonas (dos H2a, dos H2b, dos H3, dos H4

y una H1) y 200 pb de ADN. La H1 es la base y es la histona de mayor tamaño, interacciona por un lado con el exterior de la partícula núcleo (la partícula núcleo está formada por un octámero de histonas y 145 pb de ADN); por otro lado, interacciona con la molécula de ADN entrante y saliente del nucleosoma.

La doble hélice dextrógira del ADN rodea a las histonas ahora en un sentido levógiro (superenrollamiento negativo). El ADN queda expuesto sobre las histonas, está accesible para interactuar con otras proteínas. También hay extremos amino terminales de las histonas que sobresalen de los nucleosomas y a través de ellos sufren metilación, acetilación o fosforilación, lo que produce alteraciones en la condensación de la cromatina. Una misma molécula de ADN envuelve sucesivamente a distintos nucleosomas y los conecta entre sí. La porción entre dos nucleosomas sucesivos se llama ADN espaciador o ligador. La fibra de 10 nm (nucleosoma) que se enrolla sobre sí misma, formando el solenoide el otro, el siguiente nivel de condensación. Este solenoide o fibra de 30 nm contiene aproximadamente seis nucleosomas por cada vuelta de solenoide. El solenoide continúa enrollándose sobre sí mismo para formar lazos, bucles o asas radiales. De esta manera, el ADN está más enrollado sobre sí mismo formando como un andamiaje sobre un esqueleto proteico. Estos bucles constituyen lo que se conoce como unidades transcripcionales; es decir, que pueden tener un gen completo o varios genes que están regulados de forma común, los cuales pueden desenrollarse y ser transcritos.

El siguiente nivel de condensación recibe el nombre de eucromatina; y si esta continúa enrollándose, conforma la heterocromatina, la cual ya no es tradicionalmente activa. El último nivel de compactación es el cromosoma y finalmente, el cromosoma metafásico que se encuentra durante la metafase del ciclo celular y puede observarse con el microscopio óptico.

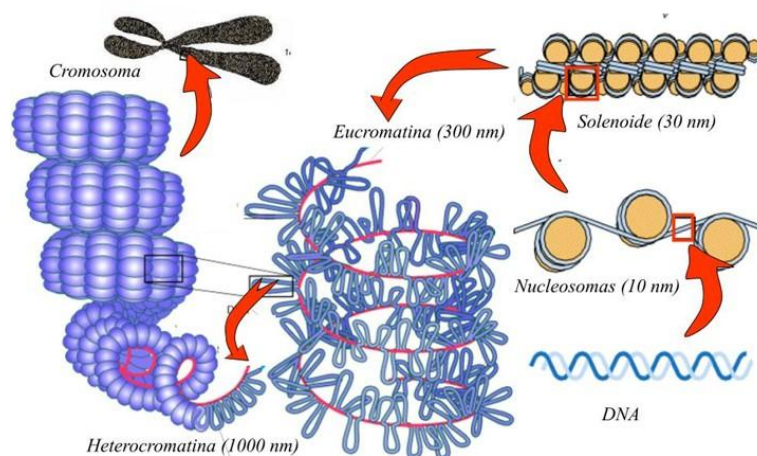


Figura 1.8. Niveles de condensación del ADN.

EL LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

Para el desarrollo de los trabajos prácticos propuestos en esta guía, es necesario conocer las normas de seguridad de un laboratorio; identificar el uso y cuidado de los materiales, instrumentos y equipos de uso frecuente en el laboratorio de Biología Molecular; y saber realizar soluciones. Por este motivo, se presentan en esta sección inicial tres apartados que deben leerse con atención y dedicación: normas de seguridad e higiene en el laboratorio; el laboratorio de biología molecular y preparaciones de soluciones de trabajo.

NORMAS DE SEGURIDAD E HIGIENE EN EL LABORATORIO

El laboratorio es un espacio de aprendizaje, investigación y construcción de conocimientos que exige responsabilidad y compromiso con la seguridad para proteger la salud de las personas y del ambiente. Estas normas buscan proteger la integridad de todas las personas, garantizar un ambiente de trabajo adecuado y fomentar hábitos que los futuros docentes puedan replicar en sus prácticas educativas.

La seguridad en el laboratorio no es solo un conjunto de reglas, sino una actitud frente al trabajo en el laboratorio. Como futuros profesores, es fundamental que comprendan estas normas no solo como un requisito de bioseguridad, sino también que las adopten desde el inicio como un ejemplo de buenas prácticas que deberán transmitir a sus propios estudiantes para garantizar ambientes de enseñanza seguros y responsables.

Normas de seguridad generales

Teniendo siempre presente que la seguridad en el laboratorio no es solo un conjunto de reglas, sino una actitud frente al trabajo científico-académico, las siguientes normas deben cumplirse durante el desarrollo de cada TP.

- Utilizar guardapolvo, calzado cerrado y guantes para evitar el contacto de cualquier sustancia con la piel.
- Mantener el cabello recogido.
- No ingerir comida, bebidas ni chicle dentro del laboratorio.
- Conocer la ubicación y uso de los elementos de seguridad en el laboratorio: matafuegos, salidas de emergencia, duchas de seguridad, lavaojos y botiquín.
- Identificar las áreas del laboratorio y los carteles con información de números de teléfono a los que llamar en caso de emergencia.
- Informar inmediatamente a las docentes ante cualquier accidente, derrame o incidente.

- Dejar libres las rutas de escape o pasillos para permitir la libre circulación (no bloquear con mochilas, muebles o equipos).
- Ubicar los elementos personales (mochilas, abrigos) en los espacios de guardado. No dejarlos sobre las mesadas de trabajo o en el piso.
- Identificar correctamente las muestras, reactivos que utiliza con la siguiente información: nombre del reactivo o muestra, concentración si corresponde, propietario y fecha de elaboración.
- Lavarse las manos antes y después de cualquier manipulación de laboratorio y antes de retirarse del mismo.

Normas de seguridad relacionadas con el orden y la limpieza del laboratorio

El orden y la limpieza en el laboratorio son esenciales para trabajar de manera eficiente y segura. Las siguientes normas apuntan a mantener los espacios organizados para prevenir accidentes y contaminaciones, y también a favorecer el aprendizaje y promover hábitos de responsabilidad como futuros docentes que transmitirán en sus propias prácticas educativas.

- Mantener despejadas y limpias las mesadas de trabajo para el desarrollo de los TP.
- Colocar los reactivos y sustancias químicas en el sector de trabajo común.
- Descartar los residuos en los contenedores destinados para tal fin.
- Al finalizar cada TP, limpiar el material utilizado y la zona de trabajo.
- Usar de manera adecuada el material y equipamiento: manipular los instrumentos con cuidado, devolverlos a su lugar y reportar cualquier daño o mal funcionamiento.
- Rotular y almacenar frascos y tubos claramente identificados para evitar confusiones.
- Prohibir alimentos y bebidas dentro del laboratorio para prevenir contaminaciones.
- Lavarse las manos antes y después de cada práctica.
- Mantener un orden al registrar datos, cuadernos de laboratorio prolijos y actualizados, lo que también fomenta hábitos de rigurosidad científica.
- Alentar el trabajo colaborativo para dejar el espacio común en condiciones óptimas para el siguiente grupo.

Normas de seguridad relacionadas con la utilización de productos químicos

El manejo de productos químicos en el laboratorio exige precaución y conocimiento de sus riesgos potenciales. El trabajo con estos requiere especial atención, ya que muchos de ellos pueden ser tóxicos, corrosivos, inflamables o contaminantes. Aplicar normas básicas de

seguridad garantiza la protección personal y colectiva, y permite desarrollar prácticas responsables que los futuros docentes deberán también transmitir en su ejercicio profesional.

- Usar elementos de protección personal (ver normas de seguridad generales).
- Previo al desarrollo de cada TP, leer el resumen de seguridad de los reactivos (ver **Anexo 1**) que utilizará, conocer sus riesgos y medidas de actuación en caso de accidente. Ampliar la información buscando la ficha de seguridad de cada uno de los reactivos.
- Rotular los recipientes de forma clara: nombre del compuesto, concentración, fecha de preparación y responsable.
- Usar campana extractora para manipular reactivos volátiles, corrosivos o tóxicos.
- Eliminar de manera segura los residuos siguiendo las indicaciones del protocolo de descarte específico para cada sustancia.
- No tocar con las manos los productos químicos y evitar pipetear con la boca, si bien en el laboratorio de Biología Molecular se utilizan mayormente micropipetas.
- No retornar nunca el exceso de producto químico al recipiente de origen.
- Utilizar puntas diferentes por cada reactivo utilizado.

Normas de seguridad relacionadas con el tratamiento de los residuos

El manejo adecuado de los residuos en el laboratorio es fundamental para garantizar la seguridad de todos los integrantes y para minimizar el impacto ambiental de las prácticas científicas y académicas. En la **Tabla 1.1** se presentan las normas básicas para eliminar (descartar o depositar) los materiales residuales (sólidos, líquidos no contaminantes, reactivos químicos) utilizados en los trabajos prácticos de Biología Molecular con el fin de promover un trabajo responsable, ordenado y en cumplimiento de la normativa institucional vigente.

Aspectos para considerar durante su trayecto en el desarrollo de cada TP de Biología Molecular

Cada TP es una oportunidad para integrar teoría y práctica, aplicar el método científico y adquirir habilidades fundamentales tanto en la investigación como en la docencia. Cada uno de los TP se organiza en dos instancias complementarias: una clase de taller teórico-práctico y otra clase práctica en laboratorio o en aula de informática. En la primera, se abordan los fundamentos conceptuales, la lectura y el análisis de protocolos, de casos, la discusión de resultados y la interpretación de datos experimentales, la resolución de situaciones problemáticas ficticias, promoviendo el pensamiento crítico y el trabajo colaborativo. En la segunda instancia, los estudiantes aplican los conocimientos adquiridos mediante la realización

de experiencias experimentales o el uso de herramientas digitales de análisis molecular, fortaleciendo las competencias técnicas y metodológicas necesarias para su formación científica y docente.

Tabla 1.1. Tratamiento de los residuos generados en los TP de Biología Molecular.

| Tipo de residuo | Ejemplos comunes | Tratamiento/eliminación |
|----------------------------------|---|---|
| Soluciones tampón simples | Tris/HCl, acetatos, fosfatos, PBS | Diluir con abundante agua y eliminar por el sistema de drenaje cloacal. |
| Soluciones tampón con detergente | SDS, Tritón X-100, Tween 20 | Depositar en contenedor de residuos líquidos con detergentes. |
| Reactivos tóxicos, corrosivos | Fenol, cloroformo, β -mercaptoetanol, | Depositar en envases herméticos etiquetados para tal fin. Nunca en el desagüe. |
| Solventes orgánicos | Etanol, isopropanol | Depositar en contenedor de residuos orgánicos líquidos. |
| Colorantes de ácidos nucleicos | GelRed (usado en los TP) | Depositar en contenedores para tal fin como residuo químico peligroso. |
| Sales inorgánicas no peligrosas | NaCl, KCl, NaOH diluido, HCl diluido | Diluir con abundante agua y eliminar por el sistema de drenaje cloacal. |
| Medios de cultivo líquido | LB, YPD | Esterilizar en autoclave y descartar por sistema de drenaje cloacal. |
| Geles de agarosa con colorantes | GelRed | Depositar en contenedores para tal fin como residuo sólido peligroso |
| Plásticos contaminados | Puntas, tubos de 0,2; 0,6; 1,5; 2; 15 o 50 mL con restos de reactivos | Si es solo con soluciones tampón, descartar como residuos comunes. Si tienen reactivos tóxicos o colorantes, descartar en contenedores como residuo químico sólido. |
| Residuos biológicos | Cultivos bacterianos, restos de micelios, muestras de sangre, esputo. | Esterilizar en autoclave y eliminar como residuo biológico en contenedores para tal fin. |

SDS: dodecil sulfato de sodio; NaCl: cloruro de sodio; KCl: cloruro de potasio; NaOH: hidróxido de sodio; HCl: ácido clorhídrico; LB: medio *Lysogeny broth* para cultivo bacteriano; YPD: medio extracto de levadura, peptona y dextrosa para cultivo de levaduras.

A lo largo de cada TP, se incluyen apartados destinados a la reflexión docente y se proponen actividades didácticas donde se invita a los estudiantes a analizar los contenidos y actividades desde una mirada pedagógica. Estos espacios buscan vincular la experiencia científica con la práctica educativa, promoviendo la construcción del rol docente, la elaboración de propuestas didácticas y la integración de la Biología Molecular en contextos de enseñanza diversos.

Por todo lo expuesto, los TP son más que procedimientos técnicos, son oportunidades para aprender a pensar, observar, analizar y enseñar ciencia. Para aprovechar al máximo estas experiencias, se recomienda tener en cuenta los siguientes aspectos:

- Lectura previa: revisar los objetivos y la introducción teórica e identificar los conceptos clave y relacionarlos con los contenidos ya vistos en la clase teórica y en el taller.
- Preparación personal: concurrir al laboratorio con guardapolvo, guantes descartables, cuaderno y material de escritura.
- Desarrollo en el laboratorio: seguir cuidadosamente los procedimientos indicados por las docentes y respetar las normas de higiene, orden y seguridad. Registrar en el cuaderno de laboratorio cada paso, observación y resultado, incluso si difiere de lo esperado.
- Trabajo colaborativo: coordinar las tareas dentro del grupo para favorecer el trabajo en equipo.
- Análisis de resultados: comparar lo obtenido con lo esperado según la teoría y reflexionar sobre posibles errores, limitaciones y aplicaciones de la técnica utilizada. Discutir las observaciones con el grupo y con el docente.
- Actividades complementarias: realizarlas y relacionar los resultados con temas vistos en otras asignaturas como Biología Celular y Genética.

Reflexión para la práctica docente

En los próximos TP, se sugiere identificar qué aspectos de estos podrían ser útiles para enseñar biología en otros niveles educativos y reflexionar sobre cómo adaptar la experiencia a diferentes contextos escolares. Asimismo, en cada uno, se les ofrecerá una actividad en este ámbito que pueden considerar y practicar en sus quehaceres educativos.

TALLER Y TRABAJO PRÁCTICO n.º 1: EL LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR - EXTRACCIÓN DE ADN

OBJETIVOS

Los objetivos del taller n.º 1 son:

- Reconocer la distribución de los sectores materiales, reactivos y equipos del laboratorio de Biología Molecular.
- Profundizar en las unidades de concentración utilizadas en Biología Molecular.
- Identificar potenciales muestras para extracción de ADN, comprendiendo este procedimiento.

Los objetivos del TP n.º 1 son:

- Manejar con precisión instrumentos volumétricos como micropipetas automáticas.
- Conocer y poner en práctica los pasos fundamentales de la extracción de ADN comprendiendo el rol de cada reactivo en el proceso.
- Desarrollar competencias técnicas y actitudinales en el laboratorio, incorporar buenas prácticas de bioseguridad, manejo responsable de reactivos y trabajo colaborativo.

FUNDAMENTO TEÓRICO DEL LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

El laboratorio de Biología Molecular es un espacio diseñado para el estudio de los procesos que ocurren a nivel del ácido desoxirribonucleico (ADN), ácido ribonucleico (ARN) y proteínas, permitiendo comprender las bases moleculares de la vida. Constituye un entorno de aprendizaje práctico en el que se integran conocimientos de Biología Celular, Genética y Química Biológica. El laboratorio de Biología Molecular es un entorno que combina la teoría con la práctica, donde los estudiantes aprenden no solo a manejar técnicas y equipos especializados, sino también a trabajar con responsabilidad, seguridad y sentido crítico.

Áreas principales del laboratorio de biología molecular

Un laboratorio de biología molecular se divide en diferentes sectores, cada uno con funciones específicas:

- Área de manejo de muestras, preparación de reactivos y soluciones. Incluye mesadas con instrumentos básicos para la manipulación de muestras y cultivos; y para pesar reactivos, preparar diluciones.
- Área de extracción de macromoléculas: con equipos de rutina como vórtex, bloques térmicos, macro y microcentrífugas para extraer ADN, ARN y proteínas.

- Área de visualización y cuantificación de macromoléculas. En esta zona se encuentran equipos especializados como cubas electroforéticas, nanodrop, transiluminador, espectrofotómetro para visualizar y cuantificar ADN, ARN y proteínas
- Área de amplificación de ácidos nucleicos. Esta zona está situada de manera restrictiva, su acceso es solo para usuarios capacitados en este proceso para evitar contaminaciones cruzadas. En ella se encuentran equipos especializados como termocicladores comunes y *real time* para amplificación de ADN y ARN; instrumentos como micropipetas y materiales de plástico destinados a usarse únicamente en esta zona.
- Área de conservación de muestras: con freezers y heladeras para almacenamiento de reactivos y material biológico.

Instrumentos y equipos habituales

En el laboratorio de Biología Molecular se utilizan instrumentos que permiten la manipulación precisa de pequeñas cantidades de material y la obtención de resultados confiables. En la **Figura 1.9** se muestran los instrumentos y equipos más utilizados en el desarrollo de los TP de Biología Molecular.

Materiales y elementos de uso frecuente

Además de los equipos, en el desarrollo de los TP de Biología Molecular se trabaja con materiales de laboratorio básicos y descartables (**Figura 1.10**). También, parte elemental de este tipo de laboratorio son los reactivos, sustancias que interactúan y provocan una reacción química para revelar la presencia o medir la cantidad de otra sustancia (drogas, colorantes).

| Dispositivos | Foto | Equipos | Foto |
|--|--|---|---|
| Micropipetas automáticas |  | Centrífugas de mesa |  |
| Cubas de electroforesis para separar ácidos nucleicos |  | Termo-cicladores para amplificar fragmentos de ADN |  |
| Cuba de electroforesis separa ADN y proteínas |  | Espectrofotómetro |  |
| Fuentes de poder para cubas de electroforesis |  | Nanodrop |  |
| Vórtex |  | Bloques térmicos |  |
| Geles |  agarosa poliacrilamida | Transiluminador |  |

Figura 1.9. Equipos y dispositivos de uso común en el laboratorio de Biología Molecular.

| Materiales | Foto | Materiales | Foto |
|---------------------------------|---|---|---|
| Tubos de 1,5 mL |  | Puntas o tips azules (de 100 a 1000 µL) |  |
| Tubos de 2 mL |  | Puntas o tips amarillos (de 10 a 200 µL) |  |
| Tubos de 200 µL para PCR |  | Puntas o tips transparentes (0,1 a 10µL) |  |
| Tubos de 15 mL |  | Probetas |  |
| Tubos de 50 mL |  | Vasos de precipitado |  |
| Gradillas |  | Tubos de ensayo |  |

Figura 1.10. Materiales más utilizados en el laboratorio de Biología Molecular.

FUNDAMENTO TEÓRICO SOBRE PREPARACIÓN DE SOLUCIONES USADAS EN EL LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

En la enseñanza de la Biología Molecular, los docentes se enfrentan a un desafío que parece paradójico: volver a lo básico para alcanzar lo complejo. La preparación de soluciones, que

podría asumirse como un conocimiento “ya adquirido”, requiere ser abordada explícitamente incluso con estudiantes avanzados.

En este campo, se trabaja con reactivos de alta pureza y elevado costo, diseñados para evitar contaminaciones que arruinarían un procedimiento. Otro aspecto distintivo es el manejo de volúmenes extremadamente pequeños, incluso menores a microlitros, y cantidades de masa en el orden de picomoles. En este contexto, la disciplina es obligatoria ya que cualquier error de cálculo o de manipulación puede comprometer seriamente la calidad de un experimento o invalidar los resultados obtenidos.

No obstante, la enseñanza de estas prácticas no debe transmitir únicamente la idea de rigor y cuidado extremo. También debe abrir un espacio para mostrar que la experiencia y el criterio docente permiten, en determinados contextos, adaptar concentraciones o volúmenes a los objetivos de cada técnica. Así, el estudiante aprende que la Biología Molecular no es solo seguir protocolos al pie de la letra, sino también desarrollar un pensamiento crítico y flexible, indispensable para la práctica científica y docente.

Concepto y tipo de soluciones

En el trabajo de laboratorio, la noción de solución es uno de los pilares fundamentales. Se llama solución (o disolución) al sistema homogéneo que se forma cuando una sustancia se dispersa uniformemente en otra, constituyendo una sola fase visible. En este sistema, el solvente o disolvente es el componente en el cual ocurre la dispersión y el soluto es el compuesto que se disuelve y, por lo general, se encuentra en menor proporción. Los solutos pueden presentarse en cualquier estado de la materia.

La capacidad de un solvente para disolver un soluto no es infinita, depende de la naturaleza química de ambos y de la temperatura. Cuando el solvente contiene la máxima cantidad de soluto que puede disolver a una determinada temperatura, se trata de una solución saturada. Si se intenta añadir más soluto, este precipitará, generando una solución sobresaturada.

Desde un punto de vista práctico y técnico, las soluciones se clasifican en diluidas cuando la cantidad de soluto es baja; concentradas, cuando la cantidad de soluto es mayor; saturadas, cuando la cantidad de soluto es la máxima que puede disolverse; sobresaturadas, cuando la cantidad de soluto es mayor a la que el solvente puede mantener en disolución estable.

Unidades de concentración más usadas para preparar soluciones en biología molecular

Para caracterizar una solución resulta imprescindible conocer su concentración, que expresa la cantidad de soluto presente en una cantidad determinada de solvente o de solución. La concentración puede expresarse mediante:

- Unidades físicas de concentración expresan la cantidad de soluto en relación con la solución o el solvente, utilizando masa y volumen como referencia.
- Unidades químicas de concentración permiten relacionar directamente la cantidad de soluto con el número de partículas (moles o equivalentes).

Las unidades físicas son útiles en preparaciones rápidas y rutinarias, mientras que las unidades químicas permiten un control exacto de la cantidad de moléculas involucradas en los experimentos. En la **Tabla 1.2** se detallan y ejemplifican las unidades físicas y químicas más utilizadas en el laboratorio de Biología Molecular. Durante el desarrollo de TP se utilizará la molaridad debido a que resulta más práctica porque solo es necesario conocer el peso molecular del reactivo y no requiere manejar el número de equivalentes químicos, ni tampoco la densidad del disolvente.

Tabla 1.2. Unidades físicas y químicas de concentración usadas en el laboratorio de Biología Molecular.

| Tipo de unidad | Expresión | Definición | Ejemplo |
|-----------------|-----------------|--|--|
| Físicas | % m/v (sto/sn) | g de soluto en 100 mL de solución | 5 % m/v de NaCl = 5 g de NaCl en 100 mL de solución |
| | % m/m (sto/sn) | g de soluto en 100 g de solución | 10 % m/m de glucosa = 10 g de glucosa en 100 g de solución |
| | % v/v (sto/sn) | mL de soluto en 100 mL de solución | 30 % v/v de etanol = 30 mL de etanol en 100 mL de solución |
| | % m/v (sto/ste) | g de soluto en 100 mL de solvente | 7 % m/v de NaOH = 7 g NaOH en 100 mL de solvente |
| | % v/v (sto/ste) | g de soluto en 100 g de solvente | 2 % v/v de etanol = 2 mL de etanol en 100 mL de solvente |
| Químicas | Molaridad (M) | n.º de moles de soluto por L de solución: $M = \frac{\text{moles de soluto}}{\text{L de solución}}$ | 1 M NaCl = 58,44 g de NaCl en 1 L de solución |
| | Molalidad (m) | n.º de moles de soluto por 1000 g de solvente: $m = \frac{\text{moles de soluto}}{1000 \text{ g de solvente}}$ | 0,5 m glucosa = 0,5 mol de glucosa en 1000 g de agua |
| | Normalidad | n.º de equivalentes químicos de soluto por L de solución: $N = \frac{\text{equivalentes de soluto}}{\text{L de solución}}$ | |

Sto: soluto; ste: solvente; sn: solución.

Preparación de soluciones de trabajo a partir de soluciones madre

En Biología Molecular, los volúmenes y masas de trabajo son extremadamente pequeños, lo que dificulta la preparación directa de soluciones a la concentración final deseada. Por este motivo, es una práctica habitual elaborar soluciones madre o soluciones *stock* a concentraciones altas que luego pueden ser diluidas según necesidad.

Este procedimiento ofrece varias ventajas: se reduce el margen de error en la medición ya que se pesa en cantidades mayores de soluto; minimiza la contaminación de reactivos ya que se manipulan con menor frecuencia y por menos operarios, y se optimiza el tiempo de trabajo en el laboratorio, evitando tener que pesar reiteradamente los mismos compuestos cada vez que se preparan nuevas soluciones.

En la práctica, las soluciones madre se formulan a alta concentración, se ajustan al pH requerido, se pueden esterilizar según la naturaleza del compuesto, y se conservan a 4 o 20 °C durante el tiempo que garantice su estabilidad. Para realizar las soluciones de trabajo a partir de las soluciones madre, se debe diluirlas a la concentración deseada siguiendo la siguiente ecuación de equivalencia:

$$C_i V_i = C_f V_f$$

donde, C_i es concentración inicial e indica la concentración de la solución madre; V_i es volumen inicial e indica el volumen que se debe tomar de la solución madre para llegar a la concentración final de la solución de trabajo; C_f es concentración final de la solución de trabajo; y V_f es volumen final y representa el volumen de solución de trabajo que se desea preparar.

Ejemplo práctico de preparación de soluciones madre

Se debe preparar las siguientes soluciones madre para luego preparar una solución de extracción de ADN micelial. Estas son las soluciones madre a preparar:

50 mL de Tris 1 M

10 mL de EDTA 0,5 M

25 mL de NaCl 5 M

20 mL de dodecil sulfato de sodio (SDS) 20 %.

Resolución

Tris: 2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol, compuesto básico que se usa para preparar soluciones tampón y como agregado en reactivos de lisis, purificación y suspensión de ácidos nucleicos. Su peso molecular es 121,1 g/mol. Necesitamos preparar 50 mL de Tris a una

concentración 1 M. Esto significa una solución de 1 mol de Tris por cada 1000 mL (1 L) de solución y 1 M de Tris es 121,1 g/L. Entonces:

1000 mL de solución 121,1 g

50 mL de solución x

$$x = (50 \text{ mL} \times 121,1 \text{ g}) / 1000 \text{ mL}$$

$$x = 6,05 \text{ g de Tris}$$

En la práctica se pesará 6,05 g de Tris para preparar 50 mL de una solución madre de Tris a una concentración 1 M.

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético, es un quelante de iones y se usa en soluciones de extracción de ADN y soluciones tampón para corridas electroforéticas. Su peso molecular es 362 g/mol. Necesitamos preparar 10 mL de EDTA a una concentración de 0,5 M. Esto significa una solución de 0,5 mol de EDTA por cada 1000 mL de solución y 1 M de EDTA es 362 g/L. Entonces:

1 M de EDTA 362 g/L

0,5 M de EDTA x

$$x = (0,5 \text{ M} \times 362 \text{ g/L}) / 1 \text{ M}$$

$$x = 181 \text{ g/L}$$

1000 mL de solución 0,5 M 181 g

10 mL de solución 0,5 M x

$$x = (10 \text{ mL} \times 181 \text{ g}) / 1000 \text{ mL}$$

$$x = 1,81 \text{ g de EDTA}$$

En la práctica se pesará 1,81 g de EDTA para preparar 10 mL de una solución madre de EDTA a una concentración de 0,5 M.

NaCl: cloruro de sodio; las sales se agregan para estabilizar el medio salino y contribuir a la lisis de las paredes celulares (en bacterias, vegetales y hongos) y de las membranas biológicas. Su peso molecular es 58,44 g/mol. Necesitamos preparar 25 mL de NaCl a una concentración de 5 M. Esto significa una solución de 5 moles de NaCl por cada 1000 mL de solución y 1 M de NaCl es 58,44 g/L. Entonces:

1 M de NaCl 58,44 g/L

5 M de NaCl x

$$x = (5 \text{ M} \times 58,44 \text{ g/L}) / 1 \text{ M}$$

$$x = 292,2 \text{ g/L}$$

1000 mL de solución 5 M 292,2 g

25 mL de solución 5 M x

$$x = (25 \text{ mL} \times 292,2 \text{ g}) / 1000 \text{ mL}$$

$$x = 7,30 \text{ g de NaCl}$$

En la práctica se pesará 7,30 g de NaCl para preparar 25 mL de una solución madre de NaCl a una concentración de 5 M.

SDS: dodecil sulfato de sodio, es un detergente aniónico fuerte usado en soluciones de extracción de ADN, cuyas funciones principales son romper la bicapa lipídica de las membranas celulares y nucleares, liberando el contenido intracelular, incluido el ADN; y desnaturalizar las proteínas asociadas al ADN (incluidas las nucleasas que podrían degradarlo). En este caso, no es necesario conocer su peso molecular debido a que se usará una unidad física de concentración. Necesitamos preparar 20 mL de SDS a una concentración de 20 % m/v. Esto significa una solución de 20 g de SDS por cada 100 mL de solución. Entonces:

100 mL de solución 20 g de SDS

20 mL de solución x

$$x = (20 \text{ mL} \times 20 \text{ g}) / 100 \text{ mL}$$

$$x = 4 \text{ g}$$

En la práctica se pesará 4 g de SDS para preparar 20 mL de una solución madre de SDS a una concentración de 20 % m/v.

Ejemplo práctico de preparación de soluciones de trabajo con la ecuación de equivalencia

Se debe preparar 5 mL de una solución de extracción de ADN micelial. La fórmula de la solución de trabajo es la siguiente: Tris 100 mM; EDTA 50 mM; NaCl 300 mM; SDS 2 %

Las soluciones madre son las que se prepararon anteriormente: Tris 1 M; EDTA 0,5 M; NaCl 5 M y SDS 20 %.

Resolución

Solución de trabajo de Tris 0,1 M:

Para calcular lo solicitado, aplicaremos la fórmula: $C_i V_i = C_f V_f$.

Se despeja V_i para calcular la cantidad de solución madre que se debe tomar para preparar la solución de trabajo: $V_i = (C_f \times V_f) / C_i$

$$V_i = (0,1 \text{ M} \times 5 \text{ mL}) / 1 \text{ M}$$

$$V_i = 0,5 \text{ mL}$$

Solución de trabajo de EDTA 0,05 M (50 mM):

Para calcular lo solicitado, aplicaremos la fórmula: $C_i V_i = C_f V_f$.

Se despeja V_i para calcular la cantidad de solución madre que se debe tomar para preparar la solución de trabajo: $V_i = (C_f \times V_f) / C_i$

$$V_i = (0,05 \text{ M} \times 5 \text{ mL}) / 0,5 \text{ M}$$

$$V_i = 0,5 \text{ mL}$$

Solución de trabajo de NaCl 0,3 M (300 mM):

Para calcular lo solicitado, aplicaremos la fórmula: $C_i V_i = C_f V_f$.

Se despeja V_i para calcular la cantidad de solución madre que se debe tomar para preparar la solución de trabajo: $V_i = (C_f \times V_f) / C_i$

$$V_i = (0,3 \text{ M} \times 5 \text{ mL}) / 5 \text{ M}$$

$$V_i = 0,3 \text{ mL}$$

Solución de trabajo de SDS 2 %:

Para calcular lo solicitado, aplicaremos la fórmula: $C_i V_i = C_f V_f$.

Se despeja V_i para calcular la cantidad de solución madre que se debe tomar para preparar la solución de trabajo: $V_i = (C_f \times V_f) / C_i$

$$V_i = (2 \% \times 5 \text{ mL}) / 20 \%$$

$$V_i = 0,5 \text{ mL}$$

En la práctica, 5 mL de la solución de trabajo se prepararía de la siguiente forma:

Tris 1 M 0,5 mL

EDTA 0,5 M 0,5 mL

NaCl 5 M 0,3 mL

SDS 20 % 0,5 mL

Agua destilada cantidad suficiente para (c.s.p.) 5 mL (3,2 mL)

Reflexión para la práctica docente

Enseñar a calcular las concentraciones de soluciones trasciende el aspecto matemático. Se trata de un ejercicio que integra conceptos fundamentales de Química, Biología Molecular y Prácticas, y que pone en juego habilidades cognitivas de gran valor para la formación académica-científica.

En primer lugar, el cálculo de diluciones invita a los estudiantes a relacionar teoría y práctica: comprender qué significa una molaridad, cómo se transforma en masa de reactivo a

pesar, y de qué manera una solución concentrada puede derivar en múltiples soluciones de trabajo según la necesidad experimental. Este proceso convierte a la matemática en una herramienta de resolución de problemas reales y no en un fin en sí misma. El cálculo de soluciones no solo fortalece la comprensión de conceptos químicos, sino que también ejercita la precisión, el razonamiento lógico y la capacidad de planificar un procedimiento. Estas competencias son transferibles a otros contextos de la vida académica y profesional. Subrayar la importancia de medir con exactitud y de seguir un razonamiento ordenado refuerza hábitos de trabajo seguro en el laboratorio. Los errores de cálculo pueden afectar no solo la validez de los resultados experimentales, sino también la seguridad de los propios estudiantes. Además, se resalta el valor pedagógico de la flexibilidad ya que, aunque los protocolos establecen concentraciones exactas, la experiencia enseña que muchas veces es necesario adaptar diluciones o preparar soluciones a partir de lo disponible. Mostrar a los estudiantes que detrás del cálculo hay criterio y toma de decisiones fomenta la autonomía y el juicio crítico en la práctica experimental que sostendrán su futuro rol como profesionales y docentes de la Biología.

FUNDAMENTO TEÓRICO SOBRE LA EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ADN

Hoy se sabe que la información genética de todos los organismos está almacenada y transmitida de generación en generación en forma de ADN. Este hallazgo tiene una larga historia: hace más de un siglo, el bioquímico suizo Friedrich Miescher aisló por primera vez esta molécula a partir de espermatozoides de salmón y la denominó *ácido nucleico*. Una excepción interesante son los virus: aunque no se consideran organismos vivos, su material genético puede ser ADN o ARN, lo que los convierte en un ejemplo valioso para comprender la diversidad de estrategias biológicas.

En este sentido, con el tiempo se descubrió que en realidad existen dos tipos de ácidos nucleicos en las células: el ADN y el ARN. En las células eucariotas el ADN se encuentra en el núcleo de las células eucariotas, hecho que se confirmó cuando Feulgen introdujo una tinción específica para el ADN hace más de siete décadas. El ARN, en cambio, se localiza en mayor proporción en el citoplasma. En organismos procariotas, como las bacterias que carecen de núcleo, ambos ácidos nucleicos se encuentran dispersos en el citosol.

Desde el punto de vista cuantitativo, los ácidos nucleicos son componentes esenciales de la célula, representando entre un 5 y un 15 % de su peso seco. Para dimensionar su importancia,

una bacteria como *Escherichia coli* contiene alrededor de 0,1 picogramos ($0,1 \times 10^{-12}$ g) de ADN por célula, y su molécula de ADN puede extenderse hasta 1 mm de longitud. Una célula humana típica posee cerca de 6 picogramos de ADN, y la longitud de su molécula, si se desplegara, alcanzaría aproximadamente 174 cm o más.

La mayoría de las investigaciones en el área de la Biología Molecular parten del aislamiento de ácidos nucleicos, base fundamental de herramientas moleculares usadas en servicio de diagnósticos o investigación científica. La estructura del ADN lo convierte en una molécula sensible al estrés mecánico: su gran longitud facilita que se fragmente con facilidad durante las prácticas rutinarias de laboratorio. Sin embargo, una vez aislado, el ADN es relativamente estable y puede conservarse a -20 °C, deshidratado en etanol, en soluciones buffer estériles o agua.

Es importante destacar que las células contienen, además del ADN, muchas otras moléculas complejas. Por ello, el aislamiento del ADN requiere aplicar técnicas específicas que permitan separarlo del resto de los componentes celulares. La extracción de ADN es un procedimiento esencial en biología molecular, ya que permite disponer del material genético en una forma pura y estable para garantizar el éxito de técnicas posteriores, como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, del inglés *Polymerase Chain Reaction*) secuenciación, clonación o análisis genómico. Estos procedimientos varían en complejidad y pureza alcanzada, y según el origen de la muestra, pero en general comparten una serie de etapas básicas comunes que serán objeto de estudio en este TP. Los protocolos de extracción de ADN que se utilizan de rutina en los laboratorios incluyen las siguientes etapas:

1. Lisis celular
2. Purificación
3. Precipitación
4. Lavado, rehidratación y almacenamiento

1. Lisis celular

El éxito de la extracción de ADN depende en gran medida de la primera etapa, la lisis. El objetivo es romper las estructuras que protegen al ADN dentro de la célula y liberar su contenido al medio. La estrategia de lisis depende de la naturaleza de la muestra (bacterias, tejidos animales, vegetales, hongos o sangre), pero en todos los casos implica la ruptura de membranas celulares y nucleares, así como la inactivación de nucleasas, enzimas que degradan el ADN. Para lograrlo se emplea una solución de lisis combinada con diferentes métodos:

- Físicos, como calor, congelación/descongelación, homogeneización mecánica o sonicación.
- Químicos, como detergentes que disuelven lípidos y proteínas de membrana.
- Enzimáticos, como proteasas o lisozima, que degradan componentes específicos de la célula.

Cada componente de la solución de lisis celular cumple una función específica que contribuye a la ruptura de las células, la liberación del material genético y la protección del ADN frente a la degradación. A continuación, se describen las particularidades de los procesos de extracción de ADN según la naturaleza del material de partida. En el caso de muestras vegetales, fúngicas y bacterianas, son necesarias acciones extra como romper su pared celular. Otras veces, es necesario llevar a cabo una disgregación previa cuando la muestra se trata de un tejido. Más adelante, se detallan las funciones de los componentes más usados en diferentes soluciones de lisis celular, como detergentes, agentes quelantes de metales divalentes, y proteasas estables como la proteinasa K.

Lisis celular de muestras vegetales

La extracción de ADN a partir de tejidos vegetales presenta particularidades propias, debido a la compleja composición de sus células. A diferencia de las células animales, las células vegetales están rodeadas por una pared celular rígida, compuesta principalmente por celulosa, hemicelulosa, lignina y pectinas, lo que dificulta el acceso directo al contenido nuclear. La lisis celular en vegetales es un paso crítico y más complejo que en otros organismos, ya que requiere estrategias específicas para superar la barrera de la pared celular y evitar contaminantes que comprometan la pureza del ADN. Entonces, el primer desafío consiste en lograr una disrupción eficiente de la pared celular, lo que se logra combinando métodos mecánicos, como la molienda del tejido fresco o congelado en nitrógeno líquido, que fragiliza las células y facilita su ruptura; químicos, mediante el uso de detergentes como SDS que solubilizan las membranas y desnaturalizan proteínas y enzimáticos, empleando celulasas o pectinasas para degradar la pared.

Otro inconveniente que surge en la extracción de ADN a partir de muestras vegetales es la activación rápida de enzimas nucleasas. Esto sucede debido a que la lisis celular puede prolongarse demasiado debido a la ruptura de las paredes celulares. Las nucleasas se activan y rompen el material genético. Para evitar este inconveniente, se debe trabajar velozmente y a temperaturas bajas, para lo cual, previo a la extracción, se colocan los materiales que estarán en

contacto con la muestra vegetal (mortero, brazo del mortero, microtubos) a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Los detergentes y compuestos desnaturizantes de proteínas presentes en las soluciones de extracción ayudan a inactivar las nucleasas y de este modo, a prevenir la destrucción del ADN.

Un tercer desafío que conlleva la extracción de ADN de este tipo de muestras es la liberación de numerosos compuestos propios de las células vegetales, como polisacáridos, polifenoles y metabolitos secundarios, que pueden interferir en posteriores análisis moleculares. Ello resulta de la extrema divergencia que existe en la bioquímica de las especies vegetales. Para contrarrestar estos efectos, se utilizan agentes como el bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB), la polivinilpirrolidona (PVP) y el β -mercaptoetanol.

El CTAB es un detergente catiónico que desnaturiza la membrana celular y facilita la separación de los polisacáridos durante la purificación. En este último caso, se hace uso de las diferentes solubilidades del ADN y polisacáridos en CTAB dependiendo de la concentración de cloruro de sodio. A mayores concentraciones de sal, los polisacáridos son insolubles, mientras que a menores concentraciones el ADN es insoluble. Ajustando la concentración de sal en los lisados que contienen CTAB, los polisacáridos y el ADN pueden precipitarse de forma diferencial. Los tampones de extracción basados en CTAB se utilizan ampliamente para purificar el ADN de los tejidos vegetales.

Los polifenoles, al liberarse durante la maceración y lisis celular, tienden a oxidarse y formar compuestos que se unen fuertemente al ADN y a las proteínas, interfiriendo con la extracción y afectando la calidad del material genético. La PVP evita la oxidación porque elimina los polifenoles uniéndose a ellos mediante enlaces de hidrógeno y evitando que estos interactúen con el ADN. De esta forma, se obtiene un ADN puro, sin contaminantes que puedan inhibir enzimas en estudios posteriores. Otros antioxidantes como el β -mercaptoetanol previenen la oxidación de fenoles y rompen los puentes disulfuros de las proteínas.

Lisis celular de muestras a partir de cultivos fúngicos o micelio

El aislamiento de ADN a partir de cultivo fúngico es una técnica fundamental en biología molecular, ya que permite disponer del material genético necesario para estudios de identificación, caracterización genética, análisis filogenético o manipulación biotecnológica. Los hongos presentan una pared celular compleja y resistente, compuesta principalmente por quitina, glucanos y proteínas, lo que representa un desafío adicional para el proceso de extracción. Por ello, el primer paso crítico consiste en la lisis eficiente del micelio, combinando métodos mecánicos (trituration o rompimiento por congelación y maceración), químicos

(detergentes y agentes caotrópicos) y enzimáticos (quitinasas, glucanasas, proteasas) que permitan romper la pared celular y liberar el ADN. Una vez liberado, el ADN debe ser separado de otros componentes celulares como polisacáridos, proteínas y metabolitos secundarios que suelen interferir en las reacciones posteriores. De esta manera, la extracción de ADN de micelio no solo constituye un paso técnico, sino también una etapa crítica de aprendizaje, donde los estudiantes pueden apreciar cómo la estructura celular de los hongos condiciona las estrategias metodológicas empleadas en el laboratorio.

Lisis celular en muestras a partir de cultivo bacteriano

La lisis celular en la extracción de ADN bacteriano requiere tener en cuenta la naturaleza de la pared celular rica en peptidoglicano, aunque no es tan rígida y estable como las paredes celulares vegetales. Eventualmente algunos protocolos combinan métodos enzimáticos, químicos y físicos. La lisozima es la enzima más usada en el tratamiento enzimático, esta degrada el peptidoglicano de la pared celular; en bacterias Gram positivas, con pared más gruesa, este paso es particularmente importante. La función de agentes químicos como detergentes, el más usado es el SDS, es desestabilizar y solubilizar la bicapa lipídica de la membrana plasmática y desnaturalizar proteínas, incluidas las nucleasas. Métodos físicos complementarios como el calor suave o la sonicación pueden favorecer la ruptura de membranas. En protocolos más sencillos, el uso de agitaciones mecánicas contribuye a la disgregación celular.

Lisis celular de muestras de sangre entera

La extracción de ADN a partir de muestras humanas, como sangre o mucosa bucal, implica procedimientos de lisis celular adaptados a las características de cada tipo de tejido. El objetivo principal es romper las membranas celulares y nucleares para liberar el material genético, eliminando al mismo tiempo proteínas y otros componentes que podrían interferir en los análisis moleculares posteriores. En ambos casos, y al igual que con las muestras vegetales, bacterianas y fúngicas, la etapa de lisis es crítica; de su eficacia depende la calidad y cantidad del ADN recuperado. En este caso, no existe el impedimento de la pared celular, por lo que directamente se emplean detergentes para desestabilizar las membranas celulares al formar micelas con sus componentes lipídicos.

La sangre está compuesta por distintos tipos de células y elementos formes: los eritrocitos (glóbulos rojos), que transportan oxígeno; los leucocitos (glóbulos blancos), que participan en la defensa inmunológica; y las plaquetas, que intervienen en la coagulación. En el contexto de

la extracción de ADN, tanto los eritrocitos maduros como las plaquetas no resultan de interés porque carecen de núcleo y, en consecuencia, no contienen ADN. Por este motivo, el proceso de lisis celular en sangre comienza con la eliminación de eritrocitos mediante un tampón de lisis específico que rompe su membrana y permite descartar su contenido. Las plaquetas, al ser fragmentos anucleados y muy pequeños, se pierden en este mismo paso, ya que se desechan junto con el sobrenadante tras la centrifugación. Las células de mayor interés son los leucocitos, que sí poseen núcleo; a partir de ellos se procede a la ruptura de sus membranas biológicas para acceder al material genético. Para ello se utilizan detergentes como SDS o Tritón X-100, que solubilizan lípidos de membrana. Además, se incorpora proteinasa K, que digiere proteínas estructurales, histonas asociadas al ADN y nucleasas, asegurando así la liberación y protección del ADN nuclear.

Lisis celular de muestras de mucosa bucal

Respecto a la lisis celular a partir de muestra de mucosa bucal, se debe tener en cuenta que estas células epiteliales contienen núcleos con ADN, pero en menor concentración que la sangre, ya que las células de la mucosa bucal se desprenden con facilidad y suelen obtenerse mediante hisopados o enjuagues. La lisis se realiza de forma similar a la realizada a partir de sangre, usando detergentes para romper las membranas celulares y nucleares. También, se adiciona proteinasa K con el mismo fin de degradar proteínas. En algunos protocolos se añaden agentes caotrópicos, como el guanidinio, para desnaturalizar proteínas y proteger al ADN de degradación enzimática.

Funciones de los componentes más usados en las soluciones de lisis celular

En este apartado se detallan las funciones de los componentes más comunes en la elaboración de soluciones de lisis celular.

La función de las soluciones tampón o *buffers*, como el Tris-HCl y fosfatos, es mantener el pH estable, protegiendo la integridad del ADN. El Tris-HCl con pH entre 7,5 y 8,0 es muy usado en biología molecular. Los fosfatos también se emplean en algunos protocolos para mantener condiciones fisiológicas.

Los detergentes como el SDS, Tritón X-100, Tween-20, CTAB se usan para desestabilizar las membranas celulares y nucleares al solubilizar lípidos y desnaturalizar proteínas de membrana. Cada uno de estos detergentes tiene sus particularidades. El SDS es muy eficaz para la lisis en bacterias, sangre y mucosa, además de desnaturalizar proteínas. El Tritón X-100 y el Tween-20 son detergentes no iónicos, más suaves, útiles cuando se requiere preservar algunas

estructuras. El CTAB, además de romper membranas, precipita polisacáridos, por lo que se emplea en vegetales ricos en carbohidratos.

Las sales caotrópicas como el guanidinio isotiocianato, guanidinio cloruro desnaturalizan proteínas incluyendo las nucleasas y facilitan la separación del ADN. Su uso es más común en protocolos comerciales con columnas de sílica, tanto en sangre como en mucosa, tejidos y cultivos celulares.

Los quelantes, como el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), secuestran iones divalentes Mg^{2+} , Ca^{2+} , cofactores necesarios para la actividad de nucleasas. Indirectamente, el EDTA protege al ADN de la degradación enzimática por nucleasas. Se encuentra presente en la mayoría de las soluciones de lisis.

Los agentes reductores como el β -mercaptoetanol y el ditioneitol (DTT) rompen enlaces disulfuro de proteínas, ayudando a su desnaturalización. En vegetales, evitan la oxidación de polifenoles que podrían unirse al ADN e interferir en su pureza.

Las sales como el NaCl, KCl, NH_4OAc , estabilizan el ADN cargado negativamente y ayudan a la disociación de complejos proteína-ácido nucleico.

La sacarosa en altas concentraciones es un componente de la solución de lisis para extracción a partir de muestras de sangre. El aporte osmótico ejercido por la sacarosa permite la ruptura de las membranas de los glóbulos rojos. En otras palabras, la sacarosa se usa a alta concentración, pero los *buffers* de lisis están diseñados para ser hipotónicos para los eritrocitos, de manera que el agua entra, los glóbulos rojos se hinchan y se vuelven frágiles. Luego, un detergente rompe la membrana fácilmente, liberando el contenido de los eritrocitos para su eliminación.

Las enzimas como la proteinasa K digieren proteínas, incluidas histonas que empaquetan al ADN, y eliminan nucleasas. Es la enzima universal utilizada en protocolos para extracción de ADN de diferentes muestras. En protocolos especializados se pueden usar otras enzimas como la lisozima, la cual rompe enlaces β -1,4 en la pared de peptidoglucano bacteriano; las celulasas y pectinasas que degradan la pared vegetal; y las quitinasas y glucanasas que degradan la quitina y β -glucanos de la pared de hongos. Usar enzimas en esta etapa significa que se inicia el proceso de purificación del ADN al deshacerse de las proteínas.

Es importante quedarnos con el mensaje de que la solución de lisis es mucho más que un “rompe-células”; es una mezcla diseñada para desestructurar membranas y paredes celulares, inactivar nucleasas, desnaturalizar proteínas, eliminar contaminantes y preservar el ADN

intacto. Cada tipo de muestra requiere una combinación particular de estos componentes, adaptada a su complejidad estructural.

Una vez lograda la lisis, el ADN queda liberado en un extracto crudo que contiene además proteínas, lípidos y otros ácidos nucleicos que deben eliminarse en etapas posteriores de purificación, pero la eficiencia de la lisis celular es determinante para obtener una buena recuperación y calidad del ADN.

2. Purificación del ADN

Una vez realizada la lisis y las membranas celulares y organelas precipitadas tras la desnaturalización y centrifugación, ADN se encuentra liberado, pero acompañado de una gran variedad de moléculas no deseadas: proteínas, lípidos, fragmentos de membrana, polisacáridos, polifenoles y metabolitos secundarios, entre otros. Para poder utilizar este material genético en técnicas de biología molecular, es necesario realizar una purificación, cuyo objetivo es separar el ADN de todos estos contaminantes, en particular de las proteínas, y concentrarlo en una forma estable y accesible. Entre las estrategias clásicas de purificación se encuentran la digestión de proteínas, extracción por solventes orgánicos y precipitación tras el aumento de la tensión iónica del medio con el agregado de sales en alta concentración.

En la digestión de proteínas con proteasas generalmente se emplea la proteinasa K, la cual degrada proteínas estructurales y nucleasas al romper las uniones peptídicas que involucran a aminoácidos alifáticos, aromáticos o hidrofóbicos. Como todas las enzimas, esta proteasa tiene un valor de temperatura óptima que puede variar de 37 a 65 °C, dependiendo del microorganismo del cual se obtuvo, por lo cual se requiere someter al extracto a esta temperatura, es importante leer las indicaciones del fabricante. Además, la actividad de esta enzima puede ser aumentada por la adición al medio del detergente SDS.

Otro método muy utilizado para purificar el ADN de las proteínas que acompañan al extracto es la extracción empleando solventes orgánicos, como fenol, cloroformo y alcohol isoamílico. Suele utilizarse una mezcla de los solventes, donde el fenol desnaturaliza proteínas, el cloroformo facilita la separación de fases y el isoamílico reduce la formación de espuma. Como resultado, el ADN queda en la fase acuosa, mientras que proteínas y lípidos se concentran en la fase orgánica que será eliminada junto con los solventes.

Sin embargo, los solventes son inhibidores de muchas enzimas como la *Taq* polimerasa utilizada en la PCR. Además, conllevan riesgos para la salud del operador ya que ambos solventes son volátiles, el fenol puede causar quemaduras y el cloroformo puede afectar a los

hepatocitos. Por ello, se propone otra forma de extraer las proteínas del extracto donde se encuentra el ADN, aumentar la tensión iónica del medio mediante el agregado de sales en altas concentraciones. Las sales al disociarse en sus iones afectan la carga global de las proteínas. Inicialmente, el agregado de bajas concentraciones de sales puede llegar a aumentar la solubilidad de las proteínas en un fenómeno conocido como *salting in*, muy utilizado para la purificación proteica. Sin embargo, a medida que aumenta la concentración salina, la solubilidad de las proteínas disminuye y estas terminan precipitando, pudiendo ser luego concentradas por centrifugación y eliminadas fácilmente.

Existen otros métodos de purificación de ADN modernos y comerciales como las columnas de sílica, las cuales basan su principio de acción en la unión del ADN a las matrices de sílica en presencia de guanidinio. Las contaminantes se eliminan por lavados sucesivos y el ADN se recupera con agua libre de nucleasas o buffer de elución. Otro método son las perlas magnéticas recubiertas, donde el ADN se une a la superficie magnética bajo ciertas condiciones de pH y sal. Luego, con un imán se separan fácilmente los complejos ADN-perla del resto de la muestra. Ambas técnicas son rápidas, reproducibles e ideales para automatización y trabajo con múltiples muestras, por lo que son muy usadas en laboratorios de diagnóstico.

El éxito de la purificación no solo garantiza la integridad del ADN, sino también su pureza debido a que el ADN de alta calidad es fundamental para técnicas sensibles de biología molecular.

3. Precipitación del ADN

Una vez que el ADN ha sido liberado y separado de la mayoría de las proteínas y los lípidos, es necesario concentrarlo y aislarlo en una forma que permita su manipulación posterior. El ADN puede llegar a precipitar como un material fibroso, esto permite que pueda recogerse y purificarse de proteínas o ARN que pudiesen coprecipitar durante este proceso. Para ello se emplea la precipitación del ADN, un procedimiento clásico y fundamental en cualquier protocolo de extracción. Se fundamenta en las cargas negativas del ADN aportadas por los grupos fosfatos de su esqueleto. En condiciones acuosas normales, estas cargas lo mantienen soluble en el medio. Para lograr su precipitación se combinan dos factores, la adición de sales y la adición de alcoholes. Los cationes Na^+ , NH_4^+ de las sales, como NaCl, acetato de sodio, acetato de amonio, neutralizan las cargas negativas del ADN, disminuyendo su repulsión electrostática, lo que facilita que las hebras de ADN se acerquen y se agreguen. Los alcoholes, como el etanol absoluto o el isopropanol, reducen la constante dieléctrica de la solución,

disminuyendo la solubilidad del ADN en el medio acuoso. Como resultado, el ADN se aglomera y se separa de la solución. En algunos protocolos, es necesario solo la adición de alcoholes para lograr la precipitación del ADN. El etanol absoluto es el más común porque permite lavados más efectivos, aunque requiere bajas temperaturas (-20 °C) y mayor volumen. El isopropanol necesita menos volumen y puede usarse a temperatura ambiente, pero suele arrastrar más sales. Cualquiera sea el alcohol usado, luego de una mezcla suave y reposo, se forma un precipitado blanco visible, el cual se recupera por centrifugación, formando un *pellet* (del inglés, se refiere al precipitado concentrado en el fondo del tubo).

La precipitación del ADN es una estrategia simple, económica y efectiva que transforma un extracto soluble en un material genético concentrado y purificado.

4. Lavado, rehidratación y almacenamiento del ADN

El *pellet* se lava con etanol al 70 % para eliminar restos de sales, impurezas, solvente o alcohol, que pueden llegar a interferir con el uso futuro de este ADN. Una vez lavado este *pellet*, el ADN se seca brevemente a temperatura ambiente. Si se desea secar más rápidamente, se puede secar en bloque térmico, pero es importante que no supere los 60 °C para evitar la degradación del ADN. Cualquiera sea el caso, es de suma importancia secar bien el *pellet*, el cual se resuspende en agua libre de nucleasas o en un *buffer* apropiado, como Tris-EDTA (TE). Luego, pueden almacenarse a bajas temperaturas por un período considerable de tiempo.

La cantidad y calidad del ADN precipitado se evalúan posteriormente por espectrofotometría y electroforesis.

Un caso especial: aislamiento de plásmidos

La obtención de ADN plasmídico a partir de bacterias requiere un enfoque particular, ya que estos elementos genéticos difieren del cromosoma bacteriano. Los plásmidos son moléculas de ADN bicatenario, circular y extracromosómico, capaces de replicarse de manera independiente del genoma bacteriano. Muchos de ellos portan genes que confieren ventajas adaptativas, como la resistencia a antibióticos, lo que les otorga gran relevancia en microbiología clínica. Además, en biología molecular, los plásmidos constituyen herramientas fundamentales, ya que funcionan como vectores en procesos de clonación y expresión génica.

El principio clave para aislar plásmidos se basa en sus propiedades estructurales y de renaturalización. Tanto el ADN plasmídico como el cromosómico pueden desnaturalizarse mediante agentes químicos, pero al revertirse estas condiciones, los plásmidos —por ser moléculas pequeñas y superenrolladas— recuperan su estructura nativa con mayor rapidez y

fidelidad. En contraste, el ADN cromosómico, mucho más extenso, no logra renaturalizarse correctamente y se agrega, precipitando junto con restos celulares.

Este fenómeno es aprovechado en la técnica clásica de lisis alcalina. Se utiliza una base fuerte, como NaOH, para desnaturalizar tanto el ADN bacteriano como el plasmídico. Posteriormente, la adición de un ácido débil, como acetato de potasio, neutraliza la reacción, permitiendo que el ADN plasmídico vuelva a su conformación original y permanezca en solución. Mientras tanto, el ADN cromosómico precipita arrastrando proteínas y otros residuos celulares. De esta manera, en la extracción de plásmidos se aprovecha la diferencia en el comportamiento estructural del ADN durante los procesos de desnaturalización y renaturalización, lo que permite obtener ADN plasmídico puro y utilizable en múltiples aplicaciones experimentales.

Es importante señalar que la manipulación de las muestras debe hacerse con cuidado, evitando fuerzas mecánicas excesivas (como agitación vigorosa), que podrían fragmentar el ADN cromosómico y contaminar la preparación plasmídica.

Reflexión para la práctica docente

Como hemos analizado, existen múltiples estrategias para aislar y purificar ADN de manera efectiva, desde aquellas donde se utilizan recursos básicos hasta los kits comerciales, los cuales se usan cada vez más en la práctica actual. Aunque la extracción en sí misma no es un proceso particularmente complejo, no debemos subestimar su relevancia: constituye el punto de partida esencial para la aplicación de cualquier técnica de biología molecular. La calidad del ADN obtenido impactará directamente en el éxito de análisis posteriores como PCR, secuenciación, clonación o estudios de expresión génica.

Por este motivo, como futuros docentes y formadores de nuevos profesionales, debemos transmitir la importancia de optimizar la extracción de acuerdo con el tipo de muestra y el uso previsto del ADN, cultivando en los estudiantes tanto el rigor técnico como el criterio experimental necesario para garantizar resultados confiables. Enseñar la extracción de ADN no debe reducirse a la simple ejecución de pasos técnicos; es fundamental transmitir a los estudiantes que cada etapa del proceso tiene un propósito claro y un impacto directo en la calidad del material genético obtenido. Explicar la lisis celular no solo es describir un procedimiento, sino también mostrar a los estudiantes cómo se integran principios bioquímicos y estructurales (enzimas, detergentes, arquitectura celular) en una técnica aplicada. Comprender

por qué se utilizan determinados agentes y no otros les permitirá transferir este conocimiento a diferentes contextos experimentales. La purificación representa mucho más que una limpieza: es la oportunidad de comprender cómo separar el ADN de un entorno complejo, lleno de proteínas, lípidos, polisacáridos y metabolitos que pueden comprometer cualquier análisis posterior. Esta etapa invita a reflexionar sobre la importancia de la selectividad en biología molecular y sobre cómo pequeñas decisiones metodológicas pueden marcar una gran diferencia en el resultado final. La precipitación, por su parte, nos recuerda que el ADN, a pesar de su invisibilidad inicial, puede hacerse tangible. Observar la formación del *pellet* blanco en el tubo es para muchos estudiantes el primer contacto visual con la molécula portadora de la información genética. Rehidratar el ADN nos enseña que no basta con obtenerlo; es necesario estabilizarlo y conservarlo en condiciones que aseguren su integridad.

Desde lo pedagógico, esta experiencia refuerza la conexión entre la teoría molecular y la práctica de laboratorio, generando un momento de aprendizaje significativo. Estas etapas son más que una rutina experimental: constituyen un ejercicio de criterio científico, donde se pone en juego la comprensión de principios químicos y biológicos, la atención al detalle y la capacidad de anticipar el uso futuro del material aislado. Como docentes, nuestra misión es guiar a los estudiantes no solo a ejecutar los protocolos, sino también a reflexionar sobre el sentido y las implicancias de cada decisión experimental.

FUNDAMENTO TEÓRICO SOBRE LA EXTRACCIÓN DE ARN

El ARN participa activamente en la expresión de la información genética y en la regulación de numerosos procesos celulares. A diferencia del ADN, cuya función principal es almacenar la información hereditaria, el ARN actúa como un intermediario dinámico y versátil que puede encontrarse en distintas formas, cada una con roles específicos en la síntesis de proteínas y en la regulación génica. El ARN es una molécula monocatenaria que no presenta conformación estructural de orden superior. Algunos ARN alcanzan algún tipo de estructura secundaria en regiones de la molécula, gracias al plegamiento de su única hebra sobre sí misma. En general, las estructuras tridimensionales que adoptan estas moléculas son del tipo horquillas, bucles, lazos, salientes y otras, siempre que puedan aparear los nucleótidos de su única cadena con los respectivos complementarios en otra región.

Los ARN se pueden clasificar en codificantes, no codificantes y especializados. El ARN codificante es el ARN mensajero (ARNm o mRNA, del inglés), es el encargado de llevar la

información genética desde el ADN hasta los ribosomas, lugar físico donde se traduce en proteínas. Su secuencia de nucleótidos determina la secuencia de aminoácidos de la proteína sintetizada. El ARNm representa una baja proporción en relación con todo el ARN total y, por lo general, posee una vida media corta. Varias proteínas suelen unirse a las moléculas de ARNm por lo que su estructura usualmente es sencilla y formada por adenina, guanina, citosina y uracilo, siendo este último nucleótido propio del ARN.

Los ARN no codificantes no se traducen en proteínas, pero cumplen funciones estructurales, catalíticas y reguladoras. Entre estos últimos se encuentran los ARN constitutivos, imprescindibles para la traducción y el procesamiento y los ARN reguladores, los cuales modulan la expresión génica. Dentro de los ARN constitutivos, se encuentran los siguientes:

- ARN ribosómico (ARNr o rRNA, del inglés), principal componente estructural y funcional de los ribosomas, donde se lleva a cabo la síntesis de proteínas. constituye el soporte y componente fundamental de los ribosomas. Constituyen aproximadamente el 75 % del RNA total, con alto contenido de nucleótidos infrecuentes. Su conformación es compleja y se relaciona con su función estructural de los ribosomas.
- ARN de transferencia (ARNt o tRNA, del inglés), transporta aminoácidos específicos al ribosoma, permitiendo la incorporación correcta en la cadena polipeptídica. Constituyen una porción importante del ARN total celular. Son moléculas de estructura tridimensional compleja, poseen dos regiones, una encargada de interactuar con el aminoácido y otra encargada de reconocer al triplete en el ARNm que codifica para dicho aminoácido. La célula posee distintos ARNt, al menos uno para cada aminoácido. La estructura tridimensional final que adopta una molécula de tRNA es una “L” invertida (Γ) donde se encuentra la región que interactúa con el aminoácido y la que interactúa con el ARNm.
- ARN nuclear pequeño (snRNA), participa en el procesamiento del ARNm (corte y empalme/*splicing*) dentro del núcleo.
- ARN nucleolar pequeño (snoRNA), interviene en la maduración y modificación química de los ARNr.

Entre los ARN reguladores se encuentran:

- ARN micro (miRNA), moléculas cortas de aproximadamente 22 nucleótidos que regulan la expresión génica uniéndose a ARNm y promoviendo su degradación o inhibiendo su traducción.

- ARN de interferencia pequeña (siRNA), similares al miRNA, participan en el silenciamiento génico mediante degradación específica de ARNm.
- ARN largos no codificantes (lncRNA), de más de 200 nucleótidos, con funciones en la regulación de la transcripción, organización cromatínica y modulación de la expresión génica.
- ARN Piwi-interactuantes (piRNA), protegen al genoma en células germinales, silenciando elementos transponibles.

Existen ARN especializados:

- ARN de interferencia natural (endo-siRNA), que actúan como reguladores endógenos de la expresión.
- ARN circular (circRNA) los cuales son ARN no lineales con funciones regulatorias emergentes.
- ARN mitocondriales y cloroplásticos: cumplen funciones similares a ARNm, ARNr, ARNt, pero dentro de estos orgánulos.

La extracción de ARN constituye un paso fundamental en biología molecular, dado que permite estudiar los patrones de expresión génica en diferentes condiciones fisiológicas, patológicas o experimentales. La extracción de ARN es una herramienta esencial para investigaciones en genómica, transcriptómica, diagnóstico molecular y biotecnología aplicada, siendo una práctica formativa clave en la enseñanza de la biología molecular.

Desde el punto de vista químico, la mínima diferencia provocada por la ausencia de un grupo $-OH$ en el C-2' de la desoxirribosa que constituye el ADN (y la presencia de dicho grupo en el C-2' de la ribosa que constituye el ARN) provoca una gran discrepancia a nivel de reactividad, funcionalidad y constitución de las moléculas. Sin embargo, la relativa similitud entre el ADN y el ARN permite establecer cierto rango de analogía entre los protocolos de extracción de ambos, teniendo en cuenta que, a diferencia del ADN, el ARN es una molécula altamente inestable y susceptible a la degradación por acción de enzimas ARNasas, presentes de manera ubicua en el ambiente y en las propias células. Prácticamente, toda manipulación de la célula desencadenará la lisis del ARN, en especial por parte de las nucleasas. Además, el medio ambiente (a través de las esporas fúngicas y bacterias), así como las manos del manipulador (debido a la flora bacteriana normal presente en la piel) pueden aportar ribonucleasas.

La extracción de ARN constituye una de las etapas más delicadas dentro de la biología molecular, ya que se trabaja con una molécula altamente inestable y susceptible a degradación. A lo largo de los años se han desarrollado múltiples estrategias para aislarla, desde protocolos clásicos basados en solventes orgánicos hasta métodos modernos con columnas de sílica o perlas magnéticas. Aunque todos requieren condiciones de extrema precaución, reactivos específicos y ambientes libres de contaminantes. Independientemente de la técnica empleada, todos los procedimientos comparten tres objetivos centrales:

1. Lisis celular controlada, para liberar los ácidos nucleicos.
2. Inactivación de ARNasas, para evitar la degradación del ARN.
3. Purificación selectiva del ARN, separándolo del ADN y de las proteínas celulares.
4. Precipitación del ARN aislado.
5. Lavado, secado y almacenamiento.

Existen distintos inhibidores de ribonucleasas, por ejemplo, el fenol y el tiocianato de guanidinio, siendo este último uno de los más utilizados. En uno de los protocolos más sencillos y efectivos las células se rompen a pH bajo en presencia de altas concentraciones de tiocianato de guanidinio y, posteriormente, utilizando fenol y acetato de sodio o potasio en alta concentración, se purifica de proteínas el extracto. El hecho de la utilización de un pH bajo (alrededor de 4), provoca la protonación diferencial del ADN, afectando el coeficiente de partición del ácido nucleico entre las fases orgánica y acuosa. De este modo en la fase acuosa puede obtenerse ARN relativamente puro de ADN. Finalmente, el ARN aislado es concentrado mediante deshidratación de la molécula utilizando alcoholes.

Otro inhibidor de ARNasas es el dietilpirocarbonato (DEPC), el cual es un agente que se adiciona al agua previamente esterilizada, no se puede esterilizar junto con el agua porque a la temperatura de esterilización, el DEPC se degrada produciendo etanol y CO₂. El agua tratada con DEPC, una vez autoclavada para eliminar el exceso del reactivo, puede emplearse para lavar o preparar soluciones y materiales destinados al aislamiento y manipulación de ARN. Dado que el DEPC es tóxico e irritante, su manipulación debe realizarse bajo campana extractora, utilizando guantes, gafas y protección adecuada, evitando el contacto directo con la piel o la inhalación de vapores. Una vez finalizada la extracción, el ARN aislado puede ser almacenado a -20 °C por períodos cortos o a -70 °C por períodos más prolongados. Se puede conservar el ARN extraído hasta un año sin deterioro importante, sin embargo, el congelamiento y descongelamiento repetido del ARN aislado atenta contra su integridad.

En la actualidad, los *kits* comerciales han simplificado enormemente este procedimiento, permitiendo obtener ARN de alta pureza y calidad en menos tiempo, con menor riesgo de degradación y bajo condiciones reproducibles. Estos sistemas no solo optimizan el trabajo en el laboratorio, sino que también democratizan el acceso a técnicas complejas, facilitando su aplicación en investigación, diagnóstico y docencia.

Sin embargo, más allá de la practicidad que ofrecen los *kits*, es fundamental que los futuros docentes y profesionales comprendan los fundamentos teóricos y químicos de cada paso del proceso de extracción. Solo así podrán interpretar de manera crítica los resultados, adaptar protocolos a distintos tipos de muestras y transmitir a los estudiantes el verdadero valor de esta práctica como punto de partida para estudios de expresión génica, transcriptómica y biotecnología aplicada.

Diferencias entre extracción de ADN y ARN

Como hemos visto, ambos procesos de extracción comparten pasos básicos (lisis, purificación, precipitación y rehidratación), aunque la extracción de ARN requiere mayores cuidados debido a su inestabilidad y a la omnipresencia de ARNasas. Por ello, en el siguiente cuadro comparativo (**Tabla 1.3**) se resumen las similitudes y diferencias entre la extracción de ADN y ARN.

En el **Anexo 2** se detallan dos protocolos de extracción de ARN a partir de muestra de sangre. Uno sigue los pasos de un protocolo convencional; el otro, los pasos de un *kit* comercial.

Tabla 1.3. Comparación entre los procesos de extracción de ADN y ARN.

| Aspecto | Extracción de ADN | Extracción de ARN |
|---------------------------------------|---|---|
| Mol. objetivo | ADN, estable y bicatenario | ARN, más inestable y monocatenario |
| Estabilidad | Estable; puede conservarse por largos períodos en buffer o congelado | Muy inestable; altamente susceptible a degradación por ARNasas |
| Enzimas contaminantes | ADNasas (menos ubicuas y más fáciles de inactivar) | ARNasas (muy abundantes, resistentes y difíciles de eliminar) |
| Requerimientos de esterilidad | Moderados; limpieza general del material de laboratorio | Elevados; imprescindible material libre de ARNasas (uso de guantes, puntas y tubos) |
| Métodos clásicos | Uso de detergentes, proteinasa K, fenol-cloroformo, etanol/isopropanol | Uso de fenol-guanidina-isotiocianato, inhibidores de ARNasas |
| Métodos modernos (<i>kits</i>) | Columnas de sílica, perlas magnéticas, tiras de papel con membranas específicas | Columnas de sílica, perlas magnéticas, reactivos con guanidina elimina ARNasas |
| Etapas críticas | Lisis celular, eliminación de proteínas y precipitación del ADN | Lisis celular, inactivación de ARNasas y separación de ARN de ADN y proteínas |
| Aplicaciones principales | Identificación y variabilidad genética, clonación, secuenciación de genomas. | Análisis de expresión y regulación génica, RT-PCR, transcriptómica. |
| Dificultad relativa | Menos demandante en cuidados especiales | Más exigente por la necesidad de evitar degradación rápida |

TALLER n.º 1: EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Contenidos a desarrollar

- Muestras de análisis: tejidos sólidos, suspensiones celulares, muestras celulares de líquidos biológicos extracelulares.
- Obtención y preparación preliminar de las muestras: disociación de la muestra tisular y separación de las células.
- Tratamientos adicionales y complementarios.
- Extracción de ácidos nucleicos: por solubilidad en fases inmiscibles y por precipitación salina diferencial.
- Conservación de las muestras.

Plan de actividades

Parte I

1. Momento de lectura comprensiva (individual)

Leer los contenidos teóricos de cada uno de los puntos mencionados arriba. Bibliografía Recomendada: Biología Molecular e Ingeniería Genética, Conceptos, Técnicas y Aplicaciones en Ciencias de la Salud. Autor: José Luque y Ángel Herráez. Ed. Harcourt, S.A. Madrid, España, Cap. 11.

2. Momento de lectura comprensiva y reflexión grupal (pequeños grupos, de 3 a 4 integrantes, aquellos conformados en el aula virtual)

Leer, intercambiar a modo de diálogo, la aclaración de aquellos contenidos o conceptos que lo requieran.

3. Momento de producción grupal

Con la herramienta Cmaptools (<https://cmaptools.uptodown.com/windows>) realizar un mapa conceptual integrador de los contenidos teóricos del texto citado en el punto 1.

Parte II

4. Momento de lecto y audio comprensión (individual)

Observar el video de la explicación teórica del TP n.º 1 y leer los contenidos teóricos del Taller y TP n.º 1:

- Protocolo general de extracción de ácidos nucleicos: identificar los pasos básicos de este procedimiento.
- Muestras de análisis para la extracción de ADN desarrolladas en la guía de TP: células sanguíneas, tejido vegetal, mucosa yugal, cultivo bacteriano, cultivo fúngico, muestras

embebidas en parafina, muestras de biopsias, sangre seca en soporte sólido, extracción de plásmidos.

Actividad propuesta para la práctica docente

Momento de producción grupal (pequeños grupos, de 3 a 4 integrantes, aquellos conformados en el aula virtual). Se propone a los futuros docentes de Biología buscar y comparar protocolos de extracción de ADN de metodología sencilla utilizando material cotidiano, los cuales puedan llevarse a cabo en aulas de nivel secundario sin la necesidad de laboratorios equipados.

Asimismo, se propone el uso del simulador virtual [LabXchange](#), específicamente el simulador de utilización de micropipetas para preparar soluciones: [Micropipetting Solutions - LabXchange](#). El objetivo de usar este simulador es usar de manera correctas las micropipetas en un laboratorio: cambiar el volumen, tomar el *tip* correcto, cómo y cuándo presionar el primer y el segundo *stop*, descartar el *tip* luego de usarlo. Este tipo de simuladores resulta una estrategia interesante cuando los docentes no cuentan con laboratorios o con el equipamiento para llevar a cabo sus prácticas de enseñanza.

Fecha de entrega: próxima clase de Taller n.º 2. Los mapas conceptuales elaborados deberán ser entregados en la sección correspondiente denominada *Actividades Taller TP n.º 1* del aula virtual en un archivo Word conteniendo una carátula con los integrantes del grupo.

TRABAJO PRÁCTICO n.º 1: PROTOCOLOS DE EXTRACCIÓN DE ADN

Para llevar a cabo esta práctica, los estudiantes se organizarán en grupos de no más de cinco integrantes. Cada grupo realizará dos protocolos de extracción de ADN. Uno de ellos será el de extracción de ADN a partir de células de la mucosa bucal, por tratarse de un procedimiento sencillo y de corta duración, ideal como primera aproximación. Los estudiantes comenzarán a partir de la etapa de purificación del ADN porque la lisis celular la realizarán las docentes con 16 h de anterioridad como mínimo. El otro protocolo de extracción de ADN que realizarán puede ser a partir de sangre entera, cultivo fúngico o bacteriano. Esta metodología permitirá a los estudiantes comparar un protocolo más complejo y observar cómo varían las etapas de lisis, purificación y precipitación según el tipo de material biológico, podrán también analizar similitudes y diferencias entre distintos métodos de extracción, comprendiendo no solo la técnica, sino también el fundamento biológico y químico detrás de cada paso.

A continuación, se detallan los protocolos de extracción de ADN a utilizarse en este TP, a partir de mucosa bucal (I), sangre entera (II), cultivo fúngico (III), cultivo bacteriano (IV). Asimismo, se detallan protocolos de extracción de ADN de otras muestras que no se realizarán en la práctica, pero se utilizarán como material de análisis en el taller. Estos son protocolos a partir de muestras de tejidos vegetales (V), muestras embebidas en parafina (VI), muestras de biopsias (VII), muestras de sangre seca (VIII). Asimismo, se detalla un protocolo sencillo de extracción de ADN a partir de una muestra de banana, utilizando materiales de uso cotidiano que se pueden utilizar en el ámbito escolar (IX).

Cada protocolo incluye el tipo de muestra, los equipamientos, materiales necesarios, la forma de preparar las soluciones de trabajo a partir de las soluciones madre y el procedimiento a seguir, paso por paso. La preparación de las soluciones madre de extracción de ADN se detalla en el **Anexo 2**.

I. Protocolo de extracción de ADN a partir de mucosa yugal

Muestra

Células obtenidas a partir de exfoliación por raspaje de mucosa, utilizando un hisopo o una espátula estéril.

Equipamiento y materiales

- Baño termostático (60 °C)
- Microcentrífuga
- Micropipetas
- Vórtex
- Varillas de vidrio o de plástico
- Gradillas correspondientes a los distintos volúmenes de tubos empleados.
- Puntas (*tips*) amarillas (10-200 μ L) y azules (1000 μ L)
- Tubos de plásticos de 15 y 50 mL
- Microtubos de 1,5 mL
- Marcador indeleble

Preparación de soluciones de trabajo

- Solución TE 1 (Tris-HCl/EDTA):
Tris 1 M 1 mL (concentración final 10 mM o 0,01 M)
EDTA 0,5 M 0,2 mL (concentración final 1 mM o 0,001 M)
Agua destilada c.s.p. 100 mL
Ajustar a pH 8
Esterilizar y conservar a 4 °C
- Proteinasa K 20 mg/mL:
Comercialmente se distribuye liofilizada o en solución conteniendo glicerol (que evita que se congele). Se debe preservar a -20 °C. La actividad óptima de la enzima depende de las condiciones del ensayo y del origen de la preparación comercial, por lo cual se recomienda siempre la lectura de las indicaciones del fabricante.
- SDS 20 %:
Disolver 20 g de SDS en 100 mL de agua destilada en baño termostático para disolver el SDS.
Conservar a temperatura ambiente.
- Cloroformo:alcohol isoamílico (24:1):

Mezclar 24 mL de cloroformo con 1 mL de alcohol isoamílico. Se pueden preparar volúmenes mayores respetando dicha proporción. Mantener a temperatura ambiente en frasco ámbar oscuro.

- Acetato de potasio 3 M:
Pesar 117,6 g de acetato de sodio y disolverlo en 40 mL de agua destilada.
Esterilizar y conservar a 4 °C.
- Etanol 70 %:
Etanol absoluto 70 mL
Agua destilada c.s.p. 100 mL

Procedimiento

1. Raspar el interior de la cavidad bucal (o de la mucosa de interés) utilizando un hisopo, de modo enérgico, pero evitando laceraciones.
2. Sumergir el raspado en un microtubo de 1,5 mL. Cortar el extremo del hisopo y adicionar 800 µL de solución de extracción TEC/SDS (Tris-HCL 10 mM; EDTA 10 mM; NaCl 100 mM, SDS 2 %).
3. Adicionar 5 µL de Proteinasa K 20 mg/mL.
Nota: leer detalladamente el protocolo proveído por la empresa que comercializa la proteinasa K, donde se indica la temperatura óptima de la enzima y la concentración.
4. Incubar como mínimo 16 h a 56 °C.
Nota: hasta este paso, lo realizarán las docentes de la Cátedra. A partir de este punto del protocolo, continuarán los estudiantes.
5. Luego de la incubación, retirar el hisopo, cuidando de recuperar todo el líquido posible.
6. Adicionar 600 µL de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1). Mezclar con vórtex hasta formar emulsión y centrifugar a 12.000 rpm durante 3 minutos.
Nota: en este paso podemos observar que la solución se torna de color blanquecino y se separan las fases acuosas y orgánicas. Descartar los materiales utilizados con cloroformo: alcohol isoamílico en recipientes destinados para este fin.
7. Transferir el sobrenadante (fase acuosa) a un microtubo nuevo. Registrar el volumen de fase acuosa que se trasvasa.
Nota: tener cuidado de no tocar la fase intermedia (generalmente blanquecina) cuando trasvasamos a un microtubo nuevo.

8. Adicionar 1 volumen de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1). Agitar bien hasta formar emulsión y centrifugar nuevamente a 12.000 rpm durante 3 minutos.
9. Recuperar la fase acuosa en un microtubo nuevo.
10. Agregar a la fase acuosa 150 μ L de acetato de potasio 3 M. Agitar suavemente de forma que se observe una solución homogénea.
Nota: En este paso podemos observar que la solución se torna de color blanquecino.
11. Centrifugar por 5 minutos a 12.000 rpm y trasvasar el sobrenadante a un microtubo nuevo de 1,5 mL.
12. Precipitar el ADN con 1 mL de etanol absoluto (o con isopropanol) y agitar suavemente por inversión. Dejar 24 h a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para lograr una mejor precipitación del ADN obtenido.
13. Centrifugar 3 minutos a 12.000 rpm.
Nota: en este paso podemos observar un ovillo blanquecino; su tamaño dependerá de la cantidad de ADN extraído y de las proteínas que hayan quedado unidas a este.
14. Eliminar el etanol absoluto y lavar el *pellet* adicionando 1 mL de etanol 70 % (evitar levantar el precipitado).
15. Centrifugar por 5 minutos a 12.000 rpm y descartar el sobrenadante con extremo cuidado para no descartar el *pellet* obtenido.
Nota: En este paso tenemos que dejar el *pellet* lo más seco posible. Para ello, podemos usar una bomba de vacío, o podemos colocar los tubos en baño termostático a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ destapados hasta que se seque, o dejar en un lugar seguro secándose a temperatura ambiente.
16. Agregar al *pellet* 50 μ L de agua destilada libre de nucleasas quedando la solución con una concentración aproximada de 150 ng de ADN/ μ L.
Nota: Recordar que si le agregamos más agua, el ADN quedará más diluido.
17. Conservar el ADN extraído a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ para uso inmediato o a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para almacenamiento prolongado.

II. Protocolo de extracción de ADN a partir de sangre entera por el método de *salting out*

Protocolo propuesto por Miller *et al.* (1988) con modificaciones.

Muestra: sangre entera anticoagulada con EDTA

Materiales y equipamiento

- Baño termostático (60 °C)
- Microcentrífuga
- Micropipetas
- Vórtex
- Varillas de vidrio o de plástico
- Gradillas correspondientes a los distintos volúmenes de tubos empleados.

Materiales

- Puntas (*tips*) amarillas (10-200 μ L) y azules (1000 μ L)
- Tubos de plásticos de 15 y 50 mL
- Microtubos de 1,5 mL
- Marcador indeleble

Preparación de soluciones de trabajo

- Solución de lisis de glóbulos rojos:
Tris-HCl 1M 0,3 mL (concentración final 10 mM o 0,01 M)
Sacarosa 3,3 g (concentración final 11 %)
Tritón X-100 0,3 mL (concentración final 1 %)
Agua destilada c.s.p. 30 mL
Conservar a 4 °C.
- Solución de lisis de glóbulos blancos:
Tris 1 M 0,1 mL (concentración final 10 mM)
EDTA 0,5 M 0,04 mL (40 μ L) (concentración final 2 mM)
NaCl 6 M 0,66 mL (concentración final 400 mM)
Agua destilada c.s.p. 10 mL
Conservar a 4 °C
- Solución con proteinasa K:
Proteinasa K (20 mg/mL) 25 μ L (concentración final Proteinasa K 1 mg/mL)
SDS 20 % 25 μ L (concentración final SDS 1 %)

EDTA 0,5 M 2 μ L EDTA (concentración final 2 mM)

Agua destilada estéril 448 μ L

Conservar a -20 °C.

Nota: corroborar la concentración inicial de proteinasa K, ya que puede variar de acuerdo con el lote comprado.

- SDS 20 %:

Disolver 20 g de SDS en 100 mL de agua en baño termostático para favorecer su disolución.

Conservar a temperatura ambiente.

- Acetato de potasio 3 M:

Pesar 117,6 g de acetato de potasio y disolver en 40 mL de agua destilada.

Esterilizar y conservar a 4 °C.

- Etanol 70 %:

Etanol absoluto 35 mL

Agua destilada estéril c.s.p. 50 mL

Procedimiento

1. Tomar 500 μ L de sangre entera anticoagulada con EDTA y colocar en un microtubo de 1,5 mL.

Nota: esta cantidad de sangre puede ser menor, en ese caso, se varía proporcionalmente el resto de los reactivos.

2. Adicionar 900 μ L de solución de lisis de glóbulos rojos (Tris-HCl 10 mM; TRITON X100 1 %; sacarosa 11 %). Mezclar bien las soluciones con un vórtex suave, centrifugar 3 minutos a 12.000 rpm y descartar el sobrenadante.

3. Repetir 3 veces el paso 2 hasta eliminar los eritrocitos, cuando el *pellet* quede blanquecino.

Nota: se observará que los glóbulos blancos están en el fondo formando un *pellet*, mientras más rompemos y eliminamos los eritrocitos, nos va quedando más blanquecino el *pellet* y la solución.

4. Colocar al *pellet* 300 μ L de solución de lisis de glóbulos blancos (Tris-HCl 10 mM, pH 8, NaCl 400 mM y EDTA 2 mM; 50 μ L de solución de proteinasa K-Fermentas® (Proteinasa K 1 mg/mL; SDS 1 %; EDTA 2 mM) y 10 μ L de SDS 20%. Luego dejar en

baño termostático una hora a 60 °C. Realizar un vórtex cada 10 minutos hasta disolver el *pellet*.

Nota: leer detalladamente el protocolo proveído por la empresa que comercializa la proteinasa K, donde se indica la temperatura óptima de la enzima.

5. Agregar a la solución obtenida luego de la incubación 150 μ L de acetato de potasio 3 M. Agitar suavemente de forma que se observe una solución homogénea.

Nota: en este paso podemos observar que la solución se torna de color blanquecino.

6. Centrifugar 5 minutos a 12.000 rpm y trasvasar el sobrenadante a un microtubo nuevo de 1,5 mL.

7. Repetir los pasos 5 y 6.

8. Agregar a la solución obtenida 1 mL de isopropanol 100 % y agitar suavemente hasta que todos los componentes queden mezclados.

Nota: en este paso podemos observar un ovillo blanquecino su tamaño dependerá de la cantidad de ADN extraído y de las proteínas que hayan quedado unidas a este.

9. Centrifugar 5 minutos a 12.000 rpm y descartar el sobrenadante teniendo en cuenta no tirar el *pellet* obtenido.

10. Lavar el *pellet* con 1 mL de etanol al 70 % y agitar suavemente.

11. Centrifugar 5 minutos a 12.000 rpm y descartar el sobrenadante teniendo en cuenta no tirar el *pellet* obtenido.

Nota: en este paso se debe dejar el *pellet* lo más seco posible. Para ello, se puede usar una bomba de vacío, o colocar los tubos en baño termostático a 50 °C destapados hasta que se seque, o dejar en un lugar seguro secándose a temperatura ambiente.

12. Agregar al *pellet* 50 μ L de agua destilada libre de nucleasas quedando la solución con una concentración aproximada de 200 ng de ADN/ μ L.

Nota: recordar que si le agregamos más agua, el ADN quedará más diluido.

13. Conservar el ADN extraído a 4 °C para uso inmediato o a -20 °C para almacenamiento prolongado.

III. Protocolo de extracción de ADN a partir de cultivo fúngico o micelio

Protocolo propuesto por Fonseca *et al.* (2015)

Muestra: micelio joven de crecimiento en medio líquido de 3 días como máximo. Para hongos que esporulan, utilizar medio YES (extracto de levadura 15 g/L, sacarosa 30 g/L) para evitar la esporulación, lo que interfiere en la calidad del ADN extraído.

Equipamiento

- Baño termostático (60 °C)
- Microcentrífuga
- Micropipetas
- Vórtex
- Varillas de vidrio o de plástico
- Gradillas correspondientes a los distintos volúmenes de tubos empleados.

Materiales

- Puntas (*tips*) amarillas (10-200 μ L) y azules (1000 μ L)
- Tubos de plásticos de 15 y 50 mL
- Microtubos de 1,5 mL
- Marcador indeleble

Preparación de soluciones de trabajo

- Solución de lavado:
Tris 1 M 1 mL (concentración final 100 mM o 0,1 M)
EDTA 0,5 M 0,4 mL (concentración final 20 mM o 0,02 M)
Agua destilada c.s.p. 10 mL
Ajustar a pH 8
Conservar a 4 °C
- Solución de extracción (Tris-HCl 100 mM pH 8, NaCl 1,5 M, EDTA 50 mM pH 8, Proteinasa K 0,1 mg/mL, β -mercaptoetanol 10 mM, SDS 2 %):
Tris-HCl 1 M 1 mL (concentración final 100 mM o 0,1 M)
EDTA 0,5 M 1 mL (concentración final 50 mM o 0,05 M)
NaCl 5 M 3 mL (concentración final 1,5 M)
SDS 20 % 1 mL (concentración final 2 %)
Agua destilada c.s.p. 10 mL
Ajustar pH a 8

Conservar a 4 °C

La proteinasa K y β -mercaptoetanol se agregan en el momento de utilizar la solución.

- Cloroformo:alcohol isoamílico (24:1)
- Acetato de potasio 3 M
- Isopropanol puro
- Etanol 70 %
- Agua libre de ADNasa

Procedimiento

1. Filtrar el micelio y lavar con 1 mL de solución de lavado en frío.
2. Centrifugar a 12.000 rpm por 3 minutos. Descartar el sobrenadante. Repetir este paso dos veces.
3. Macerar el tejido con una varilla de vidrio o plástico en presencia de 800 μ L de buffer de extracción.
4. Incubar a 60 °C por una hora. Agitar en vórtex cada 10 minutos
5. Centrifugar por 5 minutos a 12.000 rpm. Recuperar el sobrenadante. Registrar el volumen recuperado.
6. Adicionar igual volumen de cloroformo:alcohol isoamilico (24:1). Agitar con vórtex 15 segundos.
7. Centrifugar a 12.000 rpm por 3 minutos. Recuperar el sobrenadante. Se puede repetir este paso una vez más.
8. Adicionar 200 μ L de acetato de potasio 3 M, mezclar por inversión.
9. Centrifugar a 12.000 rpm por 3 minutos. Recuperar el sobrenadante.
10. Precipitar el ADN con 1 mL de isopropanol 100 %.
11. Dejar precipitando 24 h.
12. Centrifugar a 12.000 rpm por 5 minutos. Eliminar el isopropanol.
13. Lavar el precipitado con 1 mL de etanol 70 %.
14. Centrifugar a 12.000 rpm por 5 minutos. Eliminar el etanol dejando a secar a temperatura ambiente.
15. Resuspender en agua destilada libre de nucleadas
16. Conservar el ADN extraído a 4 °C para uso inmediato o a -20 °C para almacenamiento prolongado.

IV. Protocolo de extracción de ADN a partir de cultivo bacteriano

Muestra: suspensión bacteriana (aproximadamente 18 a 20 h de cultivo) en caldo nutritivo o colonias bacterianas en agar nutritivo u otro medio de cultivo sólido.

Equipamientos

- Microcentrífuga
- Baño termostático
- Micropipetas
- Agitador vórtex
- Gradillas correspondientes a los distintos volúmenes de tubos empleados

Materiales

- Cultivo bacteriano en medio líquido
- Puntas (*tips*) amarillas y azules
- Tubos de plástico de fondo cónico de 50 mL y 15 mL
- Microtubos de 1,5 mL
- Marcador indeleble

Preparación de soluciones de trabajo

- Solución TE 1 (Tris-HCl/EDTA):
Tris 1 M 1 mL (concentración final 10 mM o 0,01 M)
EDTA 0,5 M 0,2 mL (concentración final 1 mM o 0,001 M)
Agua destilada c.s.p. 100 mL
Ajustar a pH 8
Esterilizar y conservar a 4 °C
- Proteinasa K 20 mg/mL:
Comercialmente se distribuye liofilizada o bien en solución conteniendo glicerol (evita que se congele).
Conservar a -20 °C.
- SDS 20 %:
Disolver 20 g de SDS en 100 mL de agua destilada en baño termostático para disolver el SDS.
Conservar a temperatura ambiente.
- Cloroformo:alcohol isoamílico (24:1):

Mezclar 24 mL de cloroformo con 1 mL de alcohol isoamílico. Se puede preparar volúmenes mayores respetando dicha proporción.

Conservar a temperatura ambiente en frasco ámbar oscuro.

- Acetato de sodio 3 M pH 7:

Pesar 246 g de acetato de sodio y disolverlo en 100 mL de agua destilada.

Ajustar a pH 7.

Esterilizar y conservar a 4 °C.

- Etanol 70 %:

Etanol absoluto 70 mL

Agua destilada c.s.p. 100 mL

- TE 1X (Tris-HCl/EDTA):

Tris 1 M 1 mL (concentración final 10 mM o 0,01 M)

EDTA 0,5 M 0,2 mL (concentración final 1 mM o 0,001 M)

Agua destilada c.s.p. 100 mL

Ajustar a pH 8, esterilizar y conservar a 4 °C.

Procedimiento

1. Partir de la suspensión de bacterias bajo estudio. La concentración mínima útil es usualmente muy baja, sin embargo, se recomienda disponer de una suspensión concentrada en bacterias. Transferir la suspensión a un microtubo cónico de 1,5 mL. Eventualmente suspender el cultivo en caldo estéril en el volumen de un microtubo de 1,5 mL.
2. Centrifugar a 12.000 rpm durante 3 minutos. Eliminar el sobrenadante y dejar el *pellet* lo más seco posible.
3. Resuspender el *pellet* en un máximo de 600 µL de solución TE 1 (10 mM Tris-HCl pH 8; 1 mM EDTA).
4. Adicionar 5 µL de Proteinasa K 20 mg/mL y mezclar con vórtex por 10 segundos.
5. Adicionar 15 µL de SDS 20 %, mezclar con vórtex por 5 segundos e incubar durante 1 h a 60 °C (agitar con vórtex cada 10 minutos).
6. Adicionar un volumen de fenol saturado en Tris-HCl. Mezclar con vórtex por 15 segundos.
7. Centrifugar 3 minutos a 12.000 rpm. Transferir la fase superior (acuosa) a un microtubo nuevo. Registrar el volumen de fase acuosa que se trasvasa.

8. Adicionar igual volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). Mezclar con vórtex durante 15 segundos.
9. Centrifugar 3 minutos a 12.000 rpm. Transferir la fase superior (acuosa) a un tubo nuevo.
Nota: puede repetirse una vez más esta última extracción con cloroformo:alcohol isoamílico.
10. Precipitar el ADN con un volumen de isopropanol frío y 1/10 de volumen de acetato de sodio 3 M pH 7. Puede permitirse la precipitación durante un tiempo, por ejemplo, durante toda la noche a -20 °C.
11. Centrifugar durante 5 minutos a 12.000 rpm.
12. Eliminar el isopropanol y lavar el *pellet* con 1 mL de etanol 70 %.
13. Volver a centrifugar a 12.000 rpm durante 5 minutos y extraer todo el alcohol. Dejar secar a temperatura ambiente.
14. Resuspender en TE 1X (10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA) o bien en agua destilada estéril.
15. Conservar el ADN extraído a 4 °C para uso inmediato o a -20 °C para almacenamiento prolongado.

V. Protocolo de extracción de ADN a partir de muestras de tejidos vegetales

Muestra

Tejido vegetal fresco congelado y molido (por ejemplo, ápices de hojas jóvenes)

Materiales y equipamiento

- Baño termostático (60 °C)
- Microcentrífuga
- Micropipetas
- Vórtex
- Varillas de vidrio o de plástico
- Gradillas correspondientes a los distintos volúmenes de tubos empleados.
- Puntas (*tips*) amarillas (10-200 μ L) y azules (1000 μ L)
- Tubos de plásticos de 15 y 50 mL
- Microtubos de 1,5 mL
- Marcador indeleble

Preparación de soluciones de trabajo

- Solución de extracción:
Tris HCl 1 M 10 mL (concentración final 100 mM o 0,1 M)
EDTA 0,5 M 10 mL (concentración final 50 mM o 0,05 M)
Agua destilada 71,6 mL
- NaCl 6 M 8,3 mL (concentración final 500 mM o 0,5 M)
Esterilizar y conservar a 4 °C.
- SDS 20 %:
Disolver 20 g de SDS en 100 mL de agua en baño termostático para favorecer su disolución.
Conservar a temperatura ambiente.
- Fenol saturado en Tris-HCl:
Fundir el fenol en baño termostático (temperatura de fusión: 80 °C).
Una vez líquido, adicionar lentamente Tris-HCl pH 7,5 hasta saturar la solución.
Permitir que se separen las dos fases y ajustar con Tris 0,1 M hasta que el pH del Tris en equilibrio sea de 7,6.

Almacenar saturado en Tris a 4 °C en frasco color caramelo (se debe evitar la oxidación del fenol, y siempre constatar el pH, no utilizándose si está oxidado o ácido).

- Fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1):

Precaución: el fenol es un solvente volátil que puede causar quemaduras de diversa consideración. El cloroformo también es volátil. Trabaje con precaución. La proporción es de 25 partes de fenol, 24 partes de cloroformo y 1 parte de alcohol isoamílico. Mezclar 25 mL de fenol saturado en Tris con 24 mL de cloroformo y 1 mL de alcohol isoamílico.

Se pueden preparar volúmenes mayores respetando dicha proporción.

Conservar a temperatura ambiente o a 4 °C.

- Etanol 70 %:

Agua destilada estéril c.s.p. 100 mL

- TE 1X (Tris-HCl/EDTA):

Tris 1 M 1 mL (concentración final 10 mM o 0,01 M)

EDTA 0,5 M 0,2 mL (concentración final 1 mM o 0,001 M)

Agua destilada c.s.p. 100 mL

Ajustar a pH 8, esterilizar y conservar a 4 °C.

Procedimiento

1. Enfriar los morteros, microtubos y todo elemento que entre en contacto con la muestra a -20 °C. No someter a la muestra a temperaturas cálidas.
2. Seleccionar las porciones más jóvenes de la muestra, evitando tomar hojas muy antiguas, o con nervaduras importantes. Congelar la muestra utilizando N₂ líquido y moler el tejido vegetal hasta obtener un polvo sumamente fino, ejerciendo un movimiento rotatorio sobre la muestra congelada. Colocar el polvo en un microtubo de 1,5 mL utilizando una espátula congelada.
3. Disolver el polvo con 800 µL de solución de extracción (Tris 100 mM pH 8, 500 mM NaCl, 50 mM EDTA). Mezclar por inversión. De acuerdo con el mayor agregado de muestra se puede adicionar mayor volumen de solución de extracción.
4. Adicionar 80 µL de SDS 20 %, mezclar con vórtex 5 segundos e incubar a 60 °C durante 1 h (agitar cada 10 minutos).
5. Adicionar igual volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1). Mezclar con vórtex durante 15 segundos.

6. Centrifugar a 12.000 rpm por 3 minutos. Transferir la fase acuosa (superior) a un microtubo nuevo. Registrar el volumen de fase acuosa que se trasvasa.
7. Adicionar igual volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). Mezclar con vórtex durante 15 segundos hasta formación de emulsión.
8. Centrifugar a 12.000 rpm por 3 minutos. Transferir la fase acuosa (superior) a un microtubo nuevo. Registrar el volumen de fase acuosa que se trasvasa.
9. Precipitar el DNA con un volumen de isopropanol frío. Se pueden utilizar 2,5 volúmenes de etanol absoluto en este paso. Dejar precipitando toda la noche a -20 °C.
10. Centrifugar a 12.000 rpm durante 5 minutos.
11. Eliminar el isopropanol y lavar el precipitado (pellet) con 1 mL de etanol 70 %.
12. Volver a centrifugar a 12.000 rpm durante 5 minutos y extraer todo el alcohol. Dejar secar a temperatura ambiente.
13. Resuspender en TE 1X (10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA) o en agua destilada estéril.
14. Conservar el ADN extraído a 4 °C para uso inmediato o a -20 °C para almacenamiento prolongado.

VI. Protocolo de extracción de ADN a partir de muestras embebidas en parafina

Protocolo propuesto por Nascimento *et al.* (2003) con modificaciones.

Muestra: tejidos embebidos en parafina presentados en microtubos cónicos de 1,5 mL libre de nucleasas.

Preparación de las soluciones madre y de trabajo

- Tris-HCl 1M pH 7.4 (solución madre):
Pesar 12,11 g de Tris y disolverlo en 100 mL de agua destilada.
Ajustar a pH 7.4 con HCl concentrado.
Esterilizar y conservar en heladera.
- EDTA 0.5M pH 8.0 (solución madre):
Pesar 93,05 g de EDTA y disolver en 500 mL de agua destilada.
Ajustar a pH 8,0 con Na(OH).
Esterilizar y conservar en heladera.
- Solución de extracción de ADN:
Tris HCl 1M 10 mL (concentración final 100 mM o 0,1 M)
EDTA 0,5M 10 mL (concentración final 50 mM o 0,05 M)
Agua destilada 71,6 mL
CINa 6 M 8,3 mL (concentración final 500 mM o 0,5 M)
Esterilizar y conservar en heladera.
- SDS 20 %:
Disolver 20 g de SDS en 100 mL de agua.
Calentar en baño termostático para favorecer su disolución.
Conservar a temperatura ambiente.
- CTAB 20 %:
Disolver 20 g de CTAB en 100 mL de agua.
Calentar en baño termostático para favorecer su disolución.
Conservar a temperatura ambiente.
- Cloroformo:alcohol isoamílico 24:1:
La proporción es de 24 partes de cloroformo y 1 parte de alcohol isoamílico.
Mezclar 24 mL de cloroformo y 1 mL de alcohol isoamílico. Se pueden preparar volúmenes mayores respetando dicha proporción.
Conservar a temperatura ambiente o 4 °C.

- Etanol 95 %:
Etanol absoluto 95 mL
Agua destilada estéril c.s.p. 100 mL
- Etanol 70 %:
Etanol absoluto 70 mL
Agua destilada estéril c.s.p. 100 mL
- TE 1X (Tris-HCl/EDTA):
Tris 1 M 1 mL (concentración final 10 mM o 0,01 M)
EDTA 0,5 M 0,2 mL (concentración final 1 mM o 0,001 M)
Agua destilada c.s.p. 100 mL
Ajustar a pH 8, esterilizar y conservar a 4 °C.

Procedimiento

1. Adicionar al tejido 1,5 mL de xilol. Incubar en bloque térmico a 55 °C, durante 30 minutos. Centrifugar a 12.000 rpm por 3 minutos y eliminar el solvente. Adicionar 1,5 mL de xilol y volver a incubar a 55 °C por 30 minutos más. Se verifica una mejor desparafinización cambiando cada 20 minutos el solvente. Luego del último cambio de solvente, centrifugar a 12.000 rpm por 5 minutos y eliminar el sobrenadante.
2. Agregar 1,5 mL de etanol absoluto. Incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos. Centrifugar a 12.000 rpm durante 3 minutos y eliminar el sobrenadante.
3. Agregar 1,5 mL de etanol 95 %. Incubar a temperatura ambiente durante 1 minuto. Centrifugar a 12.000 rpm durante 3 minutos y eliminar el sobrenadante.
4. Agregar 1,5 mL de etanol 70 %. Incubar a temperatura ambiente durante 1 minuto. Centrifugar a 12.000 rpm durante 3 minutos y eliminar el sobrenadante. Repetir la adición de etanol 70 % y la centrifugación.
5. Agregar 1,5 mL de agua destilada libre de nucleasas. Incubar a temperatura ambiente por 1 minuto. Centrifugar a 12.000 rpm durante 5 minutos y eliminar el sobrenadante.
6. Adicionar 800 µL de solución de extracción (Tris 100 mM pH 8, 500 mM NaCl, 50 mM EDTA). Adicionar SDS 20 % (concentración final 2 %), CTAB 20 % (concentración final 2 %), Proteinasa K 20 mg/mL (concentración final 0,1 mg/mL) y β-mercaptoetanol (concentración final de 10 mM; se debe adicionar el β-mercaptoetanol justo en el momento de utilizar). Mezclar por inversión. Incubar a 55 °C durante 16 h. Verificar la total digestión de los tejidos.

7. Adicionar 600 μ L de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). Mezclar con vórtex durante 15 segundos.
8. Centrifugar a 12.000 rpm por 3 minutos. Trasvasar la fase acuosa (superior) a un microtubo nuevo. Registrar el volumen de fase acuosa que se trasvasa. Repetir el paso de purificación con cloroformo:alcohol isoamílico.
9. Adicionar a la fase acuosa recuperada del paso anterior 200 μ L de acetato de potasio 3 M. Mezclar por inversión. Centrifugar a 12.000 rpm por 3 minutos. Transferir el sobrenadante a un nuevo microtubo cónico de 1,5 mL.
10. Precipitar el ADN con 1 volumen de isopropanol. Dejar precipitando durante 16 h a 4 o -20 °C.
11. Centrifugar a 12.000 rpm durante 5 minutos.
12. Eliminar el isopropanol y lavar el precipitado (*pellet*) con 1 mL de etanol 70 %.
13. Volver a centrifugar a 12.000 rpm durante 5 minutos y extraer todo el alcohol. Dejar secar a temperatura ambiente.
14. Resuspender en TE 1X (Tris-HCl 100 mM pH 8, 1 mM EDTA) o en agua destilada libre de nucleasas.
15. Conservar el ADN extraído a 4 °C para uso inmediato o a -20 °C para almacenamiento prolongado.

VII. Método de extracción de ADN a partir de biopsias

Muestra: biopsias

Preparación de soluciones de trabajo

- Solución TE 1 (Tris-HCl/EDTA):
Tris 1 M 1 mL (concentración final 10 mM o 0,01 M)
EDTA 0,5 M 0,2 mL (concentración final 1 mM o 0,001 M)
Agua destilada c.s.p. 100 mL
Ajustar a pH 8
Esterilizar y conservar a 4 °C
- Proteinasa K 20 mg/mL:
Comercialmente se distribuye liofilizada o en solución conteniendo glicerol (que evita que se congele). Se debe preservar a -20 °C.
- SDS 20 %:
Disolver 20 g de SDS en 100 mL de agua destilada en baño termostático para disolver el SDS.
Conservar a temperatura ambiente.
- Fenol saturado en Tris-HCl
Fundir el fenol en baño termostático (temperatura de fusión: 80 °C).
Una vez líquido, adicionar lentamente Tris-HCl pH 7,5 hasta saturar la solución.
Permitir que se separen las dos fases y ajustar con Tris 0,1 M hasta que el pH del Tris en equilibrio sea de 7,6. Almacenar saturado en Tris en heladera en frasco color caramelo (se debe evitar la oxidación del fenol, y siempre constatar el pH de este, no utilizándose si está oxidado o ácido).
- Cloroformo:alcohol isoamílico (24:1):
Mezclar 24 mL de cloroformo con 1 mL de alcohol isoamílico. Se pueden preparar volúmenes mayores respetando dicha proporción. Mantener a temperatura ambiente en frasco ámbar oscuro.
- Acetato de sodio 3 M pH 7:
Pesar 246 g de acetato de sodio y disolverlo en 100 mL de agua destilada.
Ajustar a pH 7.
Esterilizar y conservar a 4 °C.
- Etanol 70 %:

Etanol absoluto 70 mL

Agua destilada c.s.p. 100 mL

Procedimiento

1. Colocar en un microtubo de 1,5 mL la biopsia en solución fisiológica.
2. Pesar entre 25 y 50 mg de biopsia y colocar dentro de un microtubo de 1,5 mL. Luego, agregar 800 μ L de buffer TEC/SDS con 5 μ L de Proteinasa K- Fermentas® (117 μ g/mL). Incubar toda la noche en baño termostático a 60 °C.

Nota: los pesos de las biopsias pueden variar según el tejido. El tejido tumoral tiene células más compactadas y poco líquido, por lo que, con 25 mg, es suficiente. En cambio, los tejidos normales tienen más líquido y son más laxas, entonces debemos pesar aproximadamente 50 mg. Leer detalladamente el protocolo proveído por la empresa que comercializa la proteinasa K, donde se indica la temperatura óptima de la enzima y la concentración.

3. Agregar a la solución obtenida luego de la incubación 600 μ L de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). Agitar suavemente de forma que se observe una solución homogénea. Nota: en este paso podemos observar que la solución se torna de color blanquecino y se separan las fases acuosas y orgánicas. Descartar los materiales utilizados con cloroformo: alcohol isoamílico en recipientes destinados para este fin.
4. Centrifugar por 5 minutos a 12.000 rpm y trasvasar la fase acuosa (en la parte superior) a un microtubo nuevo de 1,5 mL. Nota: tener cuidado de no tocar la fase intermedia (generalmente blanquecina) cuando trasvasamos a un microtubo nuevo.
5. Agregar a la fase acuosa 150 μ L de acetato de potasio 3 M. Agitar suavemente de forma que se observe una solución homogénea.

Nota: en este paso podemos observar que la solución se torna de color blanquecino.

6. Centrifugar por 5 minutos a 12.000 rpm y trasvasar el sobrenadante a un microtubo nuevo de 1,5 mL.
7. Agregar a la solución obtenida 1 mL o enrasar el microtubo con isopropanol 100 % y agitar suavemente hasta que todos los componentes queden mezclados. Dejar 24 h a -20 °C para lograr una mejor precipitación del ADN obtenido.

Nota: en este paso podemos observar un ovillo blanquecino su tamaño dependerá de la cantidad de ADN extraído y de las proteínas que hayan quedado unidas a este.

8. Centrifugar por 5 minutos a 12.000 rpm y descartar el sobrenadante teniendo en cuenta no tirar el *pellet* obtenido.
9. Lavar el *pellet* con 1 mL de etanol 70 % y agitar suavemente.
10. Centrifugar por 5 minutos a 12.000 rpm y descartar el sobrenadante con extremo cuidado para no tomar el *pellet* obtenido.

Nota: En este paso tenemos que dejar el *pellet* lo más seco posible. Para ello, podemos usar una bomba de vacío, o podemos colocar los tubos en baño termostático a 50 °C destapados hasta que se seque, o dejar en un lugar seguro secándose a temperatura ambiente.

11. Agregar al *pellet* 50 µL de agua destilada libre de nucleasas quedando la solución con una concentración aproximada de 150 ng de ADN/µL.

Nota: recordar que si le agregamos más agua, el ADN quedará más diluido.

12. Conservar el ADN extraído a 4 °C para uso inmediato o a -20 °C para almacenamiento prolongado.

VIII. Protocolo de extracción de ADN a partir de sangre en soporte sólido (sangre seca) con tiras comerciales

Muestra: a partir de sangre seca utilizando tiras comerciales específicas para este fin, que permiten capturar, lavar y liberar el ADN de manera rápida y estandarizada.

Materiales y reactivos

- Muestras de sangre seca en papel filtro o tarjeta.
- Tijera o perforador estéril (para recortar el papel con la muestra).
- Tiras comerciales para extracción de ADN (Whatman FTA® o equivalentes).
- Tubos de microcentrifuga estériles de 1,5 mL.
- Agua ultrapura estéril o buffer de rehidratación provisto por el kit.
- Micropipetas y puntas estériles.
- Vórtex y microcentrífuga.

Procedimiento

1. Preparación de la muestra: con tijeras o perforador estéril, cortar un fragmento (2–3 mm) del papel que contiene la gota de sangre seca y colocar en un microtubo de 1,5 mL.
2. Carga en la tira: introducir el fragmento en la tira comercial diseñada para capturar ADN y seguir las indicaciones del fabricante respecto a la orientación de la tira.
3. Lavado: lavar la tira en la solución de lavado provista o en un *buffer* de bajo contenido salino, según protocolo del kit. Generalmente se realizan 2–3 lavados consecutivos para eliminar proteínas, hemoglobina y posibles inhibidores de la PCR. Entre cada lavado, desechar el sobrenadante con cuidado.
4. Elución del ADN: transferir la tira lavada a un nuevo tubo de microcentrifuga estéril. Agregar 50–100 μ L de agua ultrapura estéril o buffer de elución. Incubar a temperatura ambiente durante 5–10 minutos para liberar el ADN. Retirar la tira con pinza estéril, dejando el ADN en la solución.
5. Almacenamiento del ADN: conservar el ADN extraído a 4 °C para uso inmediato o a -20 °C para almacenamiento prolongado.

Nota: el método con tiras comerciales es rápido, seguro y no requiere químicos tóxicos como fenol o cloroformo. Permite obtener ADN en cantidad suficiente para PCR y análisis de marcadores genéticos, aunque la pureza puede variar según la calidad de la muestra original.

Es una técnica ideal para enseñanza, ya que reduce los riesgos y simplifica los pasos del proceso clásico de extracción.

IX. Protocolo de extracción de ADN de muestra de banana

Protocolo propuesto por Díaz *et al.* (2025)

Muestra: a partir de muestra de banana.

Materiales y reactivos

- 1/2 banana mediana
- Mortero
- Vaso de precipitado de 250 mL
- Probetas
- 200 mL agua destilada a temperatura ambiente
- 10 mL de detergente para vajillas
- 1 cucharadita de sal de mesa
- Varilla de vidrio
- Colador y gasa
- Frasco contenedor
- Tubo de ensayo
- Pipeta Pasteur
- Alcohol etílico frío (guardado en freezer)

Procedimiento

Los pasos 1-3 serán realizados por un integrante de cada grupo. El paso 4 lo realizarán todos los participantes.

1. *Trituración de la fruta:* colocar 1/2 banana en el mortero y pisar con el pilón hasta obtener un puré.

Nota: esto ayuda a romper las paredes celulares y liberar el contenido celular.

2. *Adición de agua destilada, detergente y sal:* colocar el puré de banana en el vaso de precipitado. Agregar agua destilada (200 mL), detergente para vajillas (10 mL) y sal de mesa (1 cucharadita). Mezclar con la varilla de vidrio para homogeneizar la mezcla.

Nota: el agua ayuda a disolver los componentes celulares, el detergente rompe las membranas celulares y nucleares, y la sal ayuda a desestabilizar las proteínas y liberar el ADN.

3. *Filtración:* después, separar la mezcla de banana a través del colador y la gasa para separar el líquido de los sólidos. Desechar los sólidos y guardar el líquido filtrado en el frasco contenedor.

Nota: este paso separa los sólidos (como las fibras de la fruta) del líquido que contiene el ADN.

4. *Adición de alcohol frío*: trasvasar 5 mL del extracto obtenido con una pipeta Pasteur a un tubo de ensayo y agregar alcohol frío.

Nota: el alcohol frío precipita el ADN, haciéndolo visible como una sustancia fibrosa y blanca en la interfaz entre el alcohol y el líquido filtrado.

Esta mini-experiencia no solo permitirá a los estudiantes observar el ADN, sino que también les brindará una comprensión básica de la importancia de esta molécula en la biología y la genética. Además, esta experiencia se adecua de manera sencilla y accesible para visibilizar la manera en que los científicos trabajan en los laboratorios para estudiar y manipular el ADN en investigaciones que van desde la medicina hasta la biotecnología.

Reflexión para la práctica docente

Al abordar distintos protocolos —desde los más simples, como la extracción a partir de mucosa bucal, hasta los más complejos, como los que utilizan sangre, tejidos vegetales o micelio fúngico— los estudiantes pueden comprender que no existe un único camino para llegar al ADN, sino que la estrategia depende siempre del tipo de muestra, los recursos disponibles y el objetivo posterior (por ejemplo, diagnóstico, clonación, o conservación de material genético).

Además, estas prácticas ofrecen un espacio para reflexionar sobre la rigurosidad en el cálculo de concentraciones, la esterilidad en la manipulación de muestras y la interpretación de resultados, competencias esenciales en biología molecular. El docente, en este sentido, tiene la responsabilidad de guiar a los estudiantes no solo en la ejecución técnica, sino también en la valoración crítica de cada metodología, invitándolos a pensar en las ventajas, limitaciones y posibles fuentes de error de cada protocolo.

Finalmente, es fundamental remarcar que la extracción de ADN, aunque parezca una tarea básica, constituye la base de la mayoría de las técnicas modernas de biología molecular. Aprender a realizarla con criterio científico, precisión y conciencia de su relevancia prepara a los estudiantes para futuros desafíos en investigación, docencia y aplicaciones biotecnológicas.

BIBLIOGRAFÍA

- Chomczynski & Sacchi (1987). *Anal Biochem* 162:156.
- Cariaga Martínez, A. & Zapata, P. D. (2007). *El laboratorio de Biología Molecular*. Edición ampliada. Editorial Universitaria de Misiones.

- Díaz, G. V., Benitez, S. F., Milde, L. B., Chelaliche, A. S., Cardozo, D. P., Guastavino, M. A., Rivero, D. A., Soto, M., Gomez, E. C., Kuchurak, M. J., Krujoski, A. M., Scherer, A. P., Linder, J. Y., Dahmer, D. Y. I., Tiscornia, M. M. & Fonseca, M.I. (2025). Guía de mini-experiencias científicas: actividades escolares con recursos al alcance de todos. 1a ed. - Posadas: Universidad Nacional de Misiones. Libro digital, PDF Archivo Digital: descarga y online . ISBN 978-950-766-269-0.
- Fonseca, M. I., Fariña, J. I., Sadanoski, M. A., D'Errico, R., Villalba, L. L. & Zapata, P. D. (2015). Decolorization of kraft liquor effluents and biochemical characterization of laccases from *Phlebia brevispora* BAFC 633. *Int Biodeter Biodegr.* 104:443–451. doi:10.1016/j.ibiod.2015.07.01.
- Luque, J. & Herráez, A. (2000). *Biología Molecular e Ingeniería Genética*. Editorial Harcourt.
- Miller, S. A., Dykes, D. D., & Polesky, H. (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic acids research*, 16(3), 1215.
- Nascimento, E. M., Spinelli, M. O., Rodrigues, C. J., & Bozzini, N. (2003). Protocolo da extração de DNA de material parafinado para análise de microssatélites em leiomioma. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, 39, 253-255.

TALLER Y TRABAJO PRÁCTICO n.º 2: VISUALIZACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

OBJETIVOS

Los objetivos del taller n.º 2 son:

- Comprender los fundamentos teóricos de la electroforesis en gel de agarosa y de la espectrofotometría en la cuantificación y evaluación de calidad de los ácidos nucleicos.
- Analizar críticamente las ventajas, limitaciones y aplicaciones de cada técnica e interpretar resultados experimentales (bandas en geles y valores espectrofotométricos) y discutir su relevancia biológica.
- Fomentar el trabajo colaborativo y reflexivo identificando cómo la calidad y pureza del ADN impactan en técnicas posteriores de biología molecular (PCR, clonación, secuenciación, entre otras).

Los objetivos del TP n.º 2 son:

- Aprender a preparar un gel de agarosa y realizar la corrida electroforética incorporando colorantes seguros para la visualización de ADN.
- Cargar muestras y marcadores de peso molecular, interpretando el patrón de migración de fragmentos de ADN.
- Utilizar un espectrofotómetro para medir la absorbancia de ADN a 260/280 nm, calcular su concentración y evaluar su pureza
- Comparar los resultados obtenidos por ambos métodos (gel vs. espectrofotometría) y analizar su complementariedad.

FUNDAMENTO TEÓRICO DE LA ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA

La electroforesis en gel de agarosa es una de las técnicas más utilizadas en biología molecular para la separación, análisis y visualización de ácidos nucleicos con tamaños entre 0,1 a 25 kb. Su fundamento se basa en que las moléculas de ADN, al estar cargadas negativamente por sus grupos fosfato, migran hacia el electrodo positivo (ánodo) cuando son sometidas a un campo eléctrico. La matriz de agarosa funciona como un tamiz molecular que retrasa el movimiento de los fragmentos según su tamaño: los fragmentos pequeños se desplazan con mayor facilidad a través de los poros del gel, mientras que los fragmentos grandes lo hacen más

lentamente. Usualmente, es posible detectar fragmentos mediante coloración con bromuro de etidio si estos se encuentran en concentraciones cercanas a los 0,25 ng.

El protocolo de trabajo se divide en cuatro etapas y se resume en la **Figura 1.11**.

5. Preparación del gel de agarosa
6. Preparación y carga de muestras
7. Corrida electroforética
8. Visualización del ADN de las muestras

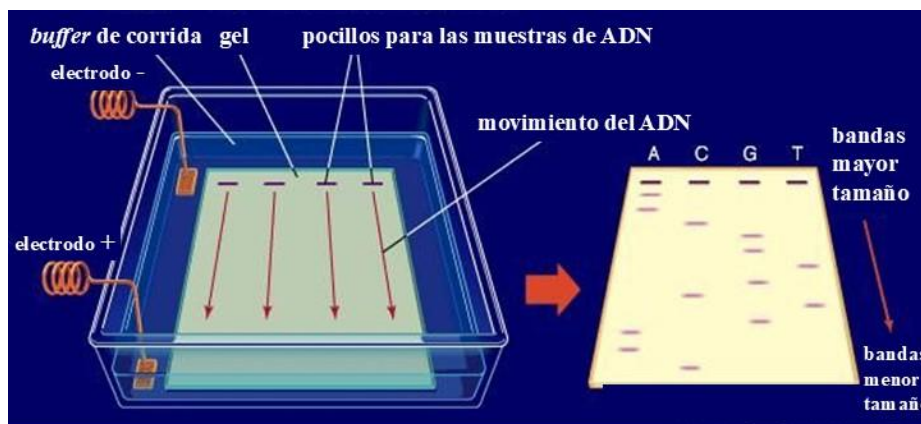


Figura 1.11. Ilustración de una electroforesis de ADN en gel de agarosa. La cuba donde se lleva a cabo la corrida electroforética (izquierda) y el gel con las bandas de ADN separadas luego de la corrida (derecha). Tomado de Encyclopedia Britannica Inc. (2007) con modificaciones.

1. Preparación del gel de agarosa

El gel de agarosa se prepara a una concentración apropiada al rango de los fragmentos a ser separados. En el laboratorio se prepara a partir de agarosa pura comercial. Para ello, la cantidad de agarosa necesaria se pesa en una balanza de precisión, y luego se disuelve en el *buffer* correspondiente mediante calentamiento hasta obtener una solución transparente y homogénea. Existen diferentes composiciones para *buffers* de corrida. Los más utilizados son:

- Tris-Acetato-EDTA (TAE): Tris Base 0,04 M; Ácido Acético Glacial 0,03 M; EDTA 0,002 M; pH 7,8. Tiene capacidad de *buffer* baja y se puede agotar en electroforesis largas.
- Tris-Borato-EDTA (TBE): Tris Base 0,89 M; Ácido Bórico 0,89 M; EDTA 0,002 M; pH 8,3. Posee una capacidad de *buffer* significativamente mayor que el TAE, pero es más costosa.

Ambos buffers se preparan en altas concentraciones y se expresan en veces o X (por ejemplo, 10X o 5X), para luego diluirse a una concentración de trabajo 1X. Este buffer se emplea para preparar la agarosa, la cual se funde en baño de agua o en microondas hasta obtener una solución transparente y homogénea.

La solución se vierte en el soporte de electroforesis, el cual debe sellarse previamente por los bordes para evitar pérdidas durante el vertido y permitir una gelificación uniforme. Es útil dejar enfriar la agarosa antes de volcarla en el soporte (a unos 45-50 °C), para evitar que aparezcan ondulaciones debido al enfriamiento desparejo, afectando la corrida y para no dañar el soporte por el calor. Una vez vertida la agarosa en el soporte, estando esta aún líquida, se debe observar que no queden burbujas en el mismo, colocando el peine (cuyos “dientes” formarán los pocillos cuando la agarosa gelifique). Observar que no se formen burbujas entre los dientes del peine. Tras gelificar, se coloca en una cuba de electroforesis. Para ello, se debe colocar el soporte en la cuba, llenar la cuba con *buffer* de corrida sumergiendo el gel, y proceder a retirar los peines.

Nota: existe otro tipo de agarosa comercial químicamente modificada que funde a baja temperatura (agarosa *low melting*), la cual presenta mayor poder resolutivo, se pueden separar y analizar fragmentos de ADN muy pequeños (10-500 pb).

2. Preparación y carga de las muestras

Las muestras que se sembrarán se mezclan con un *buffer* de carga (*loading buffer*), el cual cumple tres funciones: aumentar la densidad de la muestra, asegurar que la muestra se deposite directamente en el pocillo preparado a tal fin y otorgar color para visualizar el frente de corrida. Para ello, contiene glicerol, una sustancia densa que facilita la sedimentación de las muestras en los pocillos preparados para tal fin y que no se dispersen en el *buffer* de corrida. También contiene colorantes de seguimiento con tasa de migración conocida, lo que asegura una distancia prudencial con la muestra y sirve como frente de corrida. El colorante más usado es el azul de bromofenol. Otro colorante utilizado es el xileno-cianol.

Es importante no confundir el frente de corrida (colorante) con la tinción del ADN, ya que este colorante no se une al ADN ni permite visualizar las bandas del material genético, cuya detección se realiza posteriormente mediante tinción específica (por ejemplo, con bromuro de etidio, GelRed u otros colorantes intercalantes).

A veces, también se adicionan detergentes en bajas concentraciones con el objeto de evitar posibles contaminaciones bacterianas y fúngicas. Un *buffer* de carga sencillo y común tiene la siguiente composición:

- Glicerol 60 %
- EDTA 0,01 M
- SDS 1 %
- Azul de bromofenol 0,1 %

Nota: en este paso también se puede agregar el colorante que tiñe las moléculas de ADN. Luego, las muestras de ADN se cargan en las hendiduras del gel (*slots* o pocillos) correspondientes.

3. Corrida electroforética

Consiste en aplicar una diferencia de potencial determinada por un período de tiempo específico a la cuba que contiene el gel de agarosa con las muestras. Al conectar la corriente, las moléculas de ADN migran a través de la matriz de agarosa. Luego de conectar la fuente de poder a la cuba, si esta conexión es correcta, podremos observar la formación de burbujas en los electrodos y en unos minutos el azul de bromofenol (que constituye la mayoría de los *buffers* de carga) comienza a migrar desde el pocillo. Las muestras migrarán hacia el ánodo (polo positivo). El gel de agarosa se encuentra dentro de un recipiente (llamado coloquialmente *cama*) sumergido en el *buffer* de corrido, por lo que se denomina electroforesis submarina.

La electroforesis se lleva a cabo hasta que el frente haya migrado una distancia apropiada a lo largo del gel, que dependerá del tipo de muestra aplicada y de la experiencia y criterio del operador. Se recomienda una corrida a un voltaje apropiado intentando no superar los 45 a 60 minutos.

4. Visualización del ADN de las muestras

Para poder visualizar el ADN de las muestras es necesario utilizar algún tipo de colorante intercalante que se una al ADN y luego podamos ver. Esta tinción puede realizarse en diferentes momentos del proceso. Puede ser en un paso posterior a la corrida en sí; el colorante puede agregarse directamente al gel de modo que a medida que se produce la corrida se produce la tinción; o, como se mencionó anteriormente, el colorante puede agregarse junto al *buffer* de carga de la muestra.

Entre los colorantes intercalantes se encuentran GelRed, SYBR Safe o bromuro de etidio. Luego, el gel se observa bajo luz ultravioleta (UV) o azul, donde se detectan las moléculas de

ADN teñidas. El bromuro de etidio tiñe fácilmente los geles de agarosa. Se trata de un agente (poderoso mutagénico) que se intercala entre las bases del ADN y absorbe la radiación ultravioleta, con posterior emisión, generando una coloración rosada-anaranjada de las muestras. En general la interacción con el ADN aumenta la absorción y emisión del bromuro de etidio. La presencia del colorante puede retrasar la migración de las muestras hasta en un 15 %. Por ello, una opción válida es teñir el gel luego de la corrida. En la mayoría de los casos no se procede a desteñir el gel, pero cuando las cantidades de ácidos nucleicos son muy pequeñas (< 10 ng) se facilita su observación si se reduce el *background* coloreado, originado por el bromuro de etidio no asociado al ADN. Para ello, el gel se sumerge en agua o MgSO_4 1 mM por 20 minutos.

Tras la tinción con bromuro de etidio, es posible registrar fotográficamente la corrida, utilizando una cámara instantánea (Polaroid 667 ASA 300), cuya película es expuesta a la luz ultravioleta durante un tiempo determinado, a través de un filtro rojo/naranja (tipo Wratten 22 A de Kodak), el que sirve para eliminar la radiación de fondo que emulsiona la película. Las cámaras digitales o los celulares inteligentes con buena resolución también son útiles a los fines del registro fotográfico de corridas electroforéticas.

En la **Figura 1.12** se pueden observar fotografías de geles de agarosa luego de la electroforesis y tinción del ADN de diferentes muestras. Las bandas que se encuentran en la parte superior del gel representan los ADN genómicos de las diferentes muestras, ya que tienen pesos moleculares grandes, por lo que no migran demasiado desde el pocillo donde fueron sembradas. En los carriles 1, 2 y 3 se observa ADN de muestras de tejido vegetal. En los dos primeros carriles se observa abundante cantidad de ADN de buena calidad y un escurrido que brota de la banda manifiesta, llamado chorreado o *smear* debido a la degradación del ADN. Esto indica que se debe mejorar la metodología de extracción (suele ser un grave problema inicial en las técnicas de extracción de ácidos nucleicos vegetales). En el carril 3 se observa que el ADN sufrió una degradación importante, por lo que los ácidos nucleicos no se encontrarían en su calidad óptima. A pesar de ello, aún puede dársele varios usos como la amplificación por PCR, debido a que esta técnica es en extremo sensible y específica.

En los siguientes carriles del 4 al 7 se observan bandas correspondientes a ácidos nucleicos extraídos a partir de muestras de sangre (el volumen de partida de sangre fue 500 μL). En los carriles 4 y 5 se pueden ver bandas nítidas sin *smear* debido a una metodología de extracción eficiente, el ADN extraído se puede usar en la mayoría de los estudios moleculares posteriores.

En los carriles 6 y 7 también se ven bandas nítidas de ácidos nucleicos en alta concentración, por lo que se ve cierto rastro fluorescente. En ese caso, para técnicas posteriores como al PCR, se debe cuidar las cantidades de ácidos nucleicos agregadas; por ejemplo, un exceso de matriz de copia puede afectar a esta técnica.

En los carriles 9 y 10 se observan ácidos nucleicos a partir de muestras de mucosa, se observa un *smear* y bandas intensas de peso molecular menor al ADN genómico que indicaría contaminación con ARN.

En los carriles del 11 al 14 se muestra ADN de muestras de tejido embebido en parafina, como se puede observar, no se muestra una banda intensa de ADN como en los casos anteriores, sino un *smear*, producto de la degradación de los ácidos nucleicos.

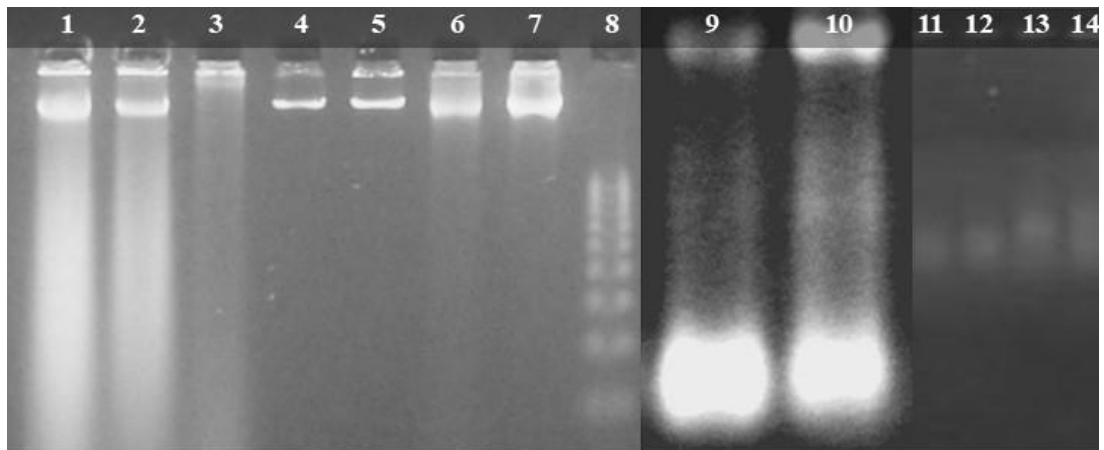


Figura 1.12. Fotografías de geles de agarosa luego de la electroforesis. Carriles 1-3, ADN a partir de muestras de tejido vegetal; carriles 4-7, ADN de muestras de sangre entera; carril 8, marcado de peso molecular; carriles 9 y 10, ADN de muestras de mucosa; ADN de muestras de tejido embebido en parafina.

Factores que afectan la electroforesis

Tamaño del ADN: la migración de los fragmentos es inversamente proporcional a sus pesos moleculares (la especie más pesada es la que menos migra). En la electroforesis, el movimiento de una partícula cargada, independientemente del soporte utilizado, depende en cierta medida de su conformación estructural. Una metodología que hace uso de este carácter es el estudio de Polimorfismos Conformacionales de cadena simple (SSCP, del inglés *Single Strand Conformational Polymorphism*). En esta metodología, se desnaturaliza la doble cadena utilizando formamida, por ejemplo, y cada una de las cadenas simples adopta una estructura

tridimensional particular. Si una base se encuentra mutada, la estructura tridimensional será distinta y esta cadena mutada migrará de un modo distinto a la otra cadena *normal*. A través de esta técnica se pueden determinar mutaciones puntuales de una dada región amplificada por PCR. Sin embargo, el soporte utilizado para esta metodología es poliacrilamida, como se verá en capítulos posteriores.

Concentración de la agarosa: la migración depende del tamaño de poro formado por la agarosa, dicho tamaño depende de la concentración de agarosa. Existe una relación lineal entre el logaritmo y la movilidad electroforética del ADN y la concentración del gel, descrita a través de fórmulas matemáticas. A mayor concentración de agarosa, mayor poder resolutivo, se pueden separar fragmentos más pequeños de ADN.

Voltaje aplicado: el voltaje aplicado a las terminales de un gel de agarosa genera un campo eléctrico con una fuerza definida por la longitud entre los electrodos y la diferencia de potencial total aplicada (se sugiere que la intensidad no debe exceder los 5 o 6 V/cm). Las moléculas de ADN expuestas a este campo eléctrico migran hacia el ánodo (polo positivo) debido a la carga negativa aportada por los grupos fosfato del esqueleto molecular. La velocidad de migración está limitada por la fuerza de fricción impuesta por la matriz del gel.

Composición de bases y temperatura: mientras que la carga y/o tamaño molecular pueden afectar la velocidad a la cual las macromoléculas se movilizan a través del gel, el cociente de carga a masa (Q/M) es el mismo para moléculas de ADN de diferente tamaño. Por ello, el tamaño del ADN es la característica que determina la velocidad de migración, permitiendo la separación de mezclas complejas por electroforesis. Además, la movilidad electroforética del ADN no se ve afectada por variaciones de temperatura (rango 4 a 30 °C), por lo que generalmente se llevan adelante corridas electroforéticas a temperatura ambiente.

Presencia de colorantes: el bromuro de etidio se intercala entre las bases de los ácidos nucleicos, pudiendo ser así visualizados los mismos a la luz ultravioleta. El bromuro de etidio puede reducir la movilidad electroforética del ADN lineal en aproximadamente un 15 %.

Composición de la solución tampón de corrida electroforética: la movilidad electroforética del ADN es afectada por la composición y la fuerza iónica de la solución tampón o *buffer* de electroforesis. Sin iones, por ejemplo, si se omitiera el buffer de corrida por error, la conductividad eléctrica sería mínima y el ADN migra muy lentamente o no lo hace. Por otro lado, si se usa un buffer de corrida con alta fuerza iónica, por ejemplo, si por error se utiliza un

buffer de corrida 10X, la conductividad eléctrica es demasiado alta y se genera calor, lo que puede fundir el gel y/o desnaturalizar el ADN.

Ventajas

- Se trata de una técnica sencilla y de bajo costo. Requiere poco equipamiento especializado.
- Permite estimar el tamaño de los fragmentos de ADN mediante el uso de marcadores de peso molecular.
- Es aplicable a diferentes tipos de ácidos nucleicos (ADN genómico, plasmídico o productos de PCR).

Desventajas

- Resolución limitada en comparación con otros sistemas, como la electroforesis en gel de poliacrilamida o la electroforesis capilar.
- Uso de colorantes que pueden ser potencialmente tóxicos o mutagénicos (p. ej., bromuro de etidio).
- Fragmentos de ADN muy grandes pueden no separarse adecuadamente.
- El método es principalmente cualitativo o semicuantitativo, por lo que no reemplaza técnicas más sensibles para análisis cuantitativo.

Electroforesis en gel de DNA plasmídico

Adaptaciones simples de los métodos electroforéticos son empleadas usualmente para la detección y caracterización física del ADN plasmídico presente en aislamientos bacterianos ambientales y clínicos. Las concentraciones comúnmente empleadas para realizar corridas plasmídicas en geles de agarosa varían entre 0,6 y 1,5 %, utilizando búferes estándares.

El ADN plasmídico generalmente se presenta en tres conformaciones: la forma circular cerrada (forma I), la circular abierta o *nicked* (forma II) y la lineal de doble cadena (forma III). Estas conformaciones del DNA conducen a que especies del mismo peso molecular migren a velocidades diferentes en geles de agarosa. La forma I migra más rápidamente que la forma III. El superenrollamiento esencialmente retuerce las moléculas sobre sí mismas, confiriéndoles un radio hidrodinámico menor, permitiéndoles pasar más fácilmente por la matriz del gel. La forma II o circular abierta, la cual ha perdido totalmente el superenrollamiento, migra de manera apreciablemente más lenta que cualquiera de las otras dos.

Electroforesis en gel de ARN total

Para el caso de las corridas electroforéticas de ARN total, la visualización es distinta. Como se indicó en el capítulo anterior, la mayor contribución al ARN total de la célula es por parte del ARNr y en menor cuantía se encuentran los ARNt y los ARNm. Por esto, la electroforesis es un buen método para analizar la integridad del ARN total: se espera encontrar dos bandas por carril. Para el caso de las muestras eucariotas una de dichas bandas pertenece al ARNr 28S y la otra al 18S, que constituyen las dos subunidades de los ribosomas. Usualmente la banda 28S suele presentar una intensidad de tinción dos veces mayor que la correspondiente a la banda 18S. También es posible visualizar un ligero *smear* entre ambas bandas que suele corresponder a los ARNt y ARNm (**Figura 1.13**).

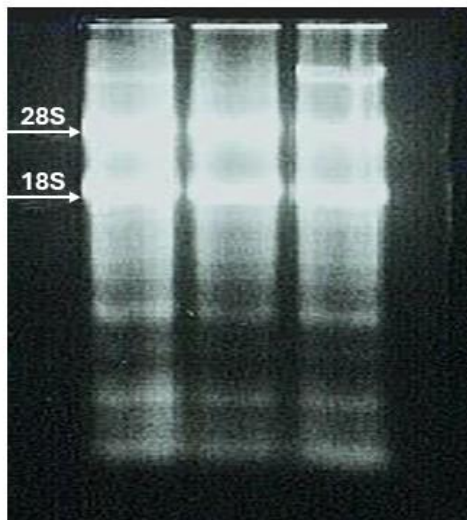


Figura 1.13. Fotografía de gel de agarosa 2 % de ARN total. Se observan bandas ribosomales de 4.5 kb 28S y 1.9 kb para 18S. Los ARNm no se pueden fraccionar pues son moléculas menos pesadas, producen un *smear* entre los 0,5 y 12 Kb.

FUNDAMENTO DE LA EVALUACIÓN DEL ADN POR ESPECTROFOTOMETRÍA

La espectrofotometría en el rango UV es una de las técnicas más utilizadas para cuantificar ADN de manera rápida, sencilla y no destructiva. Su principio se basa en la capacidad que tienen los ácidos nucleicos de absorber luz a una longitud de onda específica debido a la presencia de sus bases nitrogenadas aromáticas (adenina, timina, citosina y guanina). El máximo de absorción del ADN y ARN se encuentra en 260 nm, mientras que las proteínas (principales contaminantes de la extracción de los ácidos nucleicos) presentan un máximo a 280 nm debido principalmente a los aminoácidos aromáticos triptófano y tirosina. De esta manera, la medida de la absorbancia a ambas longitudes de onda permite saber el grado de pureza de la muestra de ADN y la absorbancia a 260 nm, permite conocer la cantidad de ADN obtenido.

La concentración de ADN se calcula a partir de la relación directa entre la absorbancia a 260 nm y la cantidad de ADN en solución. Para conocer la concentración de ADN en una muestra, se puede aplicar la Ley de Lambert-Beer (también llamada ley de Beer-Lambert) la cual establece la relación entre la absorbancia de una sustancia y su concentración en una solución. Matemáticamente, se expresa:

$$A = \epsilon \cdot d \cdot C$$

donde A es la absorbancia;

ϵ es el coeficiente de extinción molar (mL/ μ g.cm), es decir, indica cuánto absorbe una sustancia la luz a una longitud de onda específica, una preparación pura de ADN tiene un coeficiente de extinción molar ϵ_{260} de 0,027 mL/ μ g.cm;

d es la longitud de la cubeta o camino óptico;

C es la concentración.

Ejemplo de cálculo de concentración de ADN

El ADN extraído de una muestra de sangre entera se resuspende en 0,05 mL (50 μ L) de agua destilada estéril.

La Abs 260 nm en una cubeta de cuarzo de 1 cm de camino óptico es 0,264.

Se aplica la fórmula:

$$A = \epsilon \cdot d \cdot C$$

$$C = A_{260} / (\epsilon \cdot d)$$

$$C = 0,264 / (0,027 \text{ mL}/\mu\text{g} \cdot \text{cm} \times 1 \text{ cm})$$

$$C = 9,77 \mu\text{g/mL}$$

Nota: si el ADN rehidratado se diluye en mayor cantidad de agua, hay que multiplicar por el factor de dilución. Por ejemplo, si diluyo los 50 μ L de ADN en 450 μ L de agua, el factor de dilución es 10. Por tanto, se corrige por el factor de dilución:

$$C = 9,77 \mu \frac{\text{g}}{\text{mL}} \times 10$$

$$C = 97,7 \mu\text{g/mL}$$

Una manera práctica de calcular la concentración de ácidos nucleicos es por equivalencia. Por convención, una absorbancia de 1,0 a 260 nm corresponde aproximadamente a 50 μ g/mL de ADN de doble cadena, 40 μ g/mL de ARN o 33 μ g/mL de ADN de hebra simple. De esta manera, el cálculo de la concentración de ácidos nucleicos en μ g/mL en una cubeta de cuarzo puede estimarse a través de las siguientes fórmulas matemáticas:

$$C_{\mu\text{g/mL}} = A_{260} \cdot k$$

donde, k es la convención de la absorbancia a 260 nm que corresponde a ADN de doble cadena, ARN o ADN de cadena simple

Ejemplo de cálculo de concentración de ADN por convención o equivalencia

Un estudiante mide una muestra y obtiene:

- Abs 260 nm = 0,8
- Cubeta de 1 cm

Aplicando la convención o equivalencia, k para el ADN de doble cadena es 50 $\mu\text{g/mL}$:

$$C_{\mu\text{g/mL}} = A_{260} \cdot k$$

$$C_{\mu\text{g/mL}} = 0,8 \cdot 50 \mu\text{g/mL}$$

$$C_{\mu\text{g/mL}} = 40 \mu\text{g/mL}$$

La muestra tiene 40 $\mu\text{g/mL}$ de ADN.

Nota: también debe corregirse por el factor de dilución en caso de que se haya diluido la muestra.

Además de la concentración, el método de evaluación por espectrofotómetro permite evaluar la pureza de la muestra de ADN. Para ello, se debe medir la absorbancia de la muestra a dos longitudes de onda: A_{260} y A_{280} . Mediante su relación entre estas: A_{260}/A_{280} se obtiene:

- Relación $A_{260}/A_{280} = 1,6 - 1,8 \rightarrow$ ADN puro
- Relación $A_{260}/A_{280} = < 1,8 \rightarrow$ contaminación con proteínas o fenol. Debido a que la presencia de proteínas disminuye este valor de relación, ya que las mismas presentan su pico de absorción a 280 nm.
- Relación $A_{260}/A_{280} = 2,0 - 2,3 \rightarrow$ ARN puro. Si la muestra es de ADN, significa posible contaminación con ARN. Esto se debe a que la presencia de ARN aumenta el valor de la relación.
- Relación $A_{260}/A_{280} > 2,3 \rightarrow$ indica presencia de nucleótidos por posible degradación de los ácidos nucleicos.

La espectrofotometría ofrece la ventaja de no requerir reactivos adicionales y permitir una estimación inmediata de la cantidad de ADN en una muestra. Sin embargo, su precisión puede verse afectada por contaminantes (fenol, sales, proteínas, detergentes), por lo que suele complementarse con otros métodos como la electroforesis en gel o fluorometría.

TALLER No. 2: VISUALIZACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Contenidos a desarrollar

- Fraccionamiento de ácidos nucleicos: ultracentrifugación, centrifugación zonal e isopícnica. Electroforesis. Soporte. Detección del ADN. Calibración de la electroforesis. Electroforesis en campo pulsante.
- Hibridación de ácidos nucleicos: desnaturalización y renaturalización. Efecto de la temperatura. Ácidos y bases. Agentes químicos.
- Influencia de la desnaturalización sobre las propiedades del ADN: viscosidad, absorción ultravioleta. Curvas de desnaturalización.
- Análisis molecular de la hibridación de ácidos nucleicos: Ensayo de hibridación. Influencia de algunos factores. Rigor.
- Métodos de ensayos de hibridación. Fase líquida. Soporte sólido. Hibridación *in situ*. Técnicas relacionadas: transferencia Western.

Plan de actividades

Parte I

1. Momento de lectura comprensiva (individual)

Leer los contenidos teóricos de cada uno de los puntos mencionados arriba. Bibliografía Recomendada: Biología Molecular e Ingeniería Genética, Conceptos, Técnicas y Aplicaciones en Ciencias de la Salud. Autor: José Luque y Ángel Herráez. Ed. Harcourt, S.A. Madrid, España, Cap. 11 (solo fraccionamiento de ácidos nucleicos) y Cap. 13.

2. Momento de lectura comprensiva y reflexión grupal (pequeños grupos, de 3 a 4 integrantes, aquellos conformados en el aula virtual)

Leer, intercambiar a modo de diálogo, la aclaración de aquellos contenidos o conceptos que lo requieran.

3. Momento de producción grupal

Con la herramienta Cmaptools (<https://cmaptools.uptodown.com/windows>) realizar un mapa conceptual integrador de los contenidos teóricos del texto citado en el punto 1.

Parte II

4. Momento de lecto y audio comprensión (individual)

Observar los videos: explicación teórica del TP n.º 2 y leer los contenidos teóricos del TP y Taller n.º 2. Evaluación de los ácidos nucleicos extraídos: electroforesis en geles de agarosa y cuantificación por método espectrofotométrico.

5. *Momento de producción grupal (pequeños grupos, de 3 a 4 integrantes, aquellos conformados en el aula virtual)*

Con la herramienta Cmaptools (<https://cmaptools.uptodown.com/windows>) realizar un mapa conceptual integrador de las etapas del protocolo de trabajo para efectuar la evaluación de los ácidos nucleicos:

- Electroforesis en gel de agarosa, factores que afectan la migración de los ácidos nucleicos en la matriz de agarosa, y la utilidad de esta técnica para evaluar las extracciones de los ácidos nucleicos.
- Cuantificación y valoración de la pureza de los ácidos nucleicos.

Actividad propuesta para la práctica docente.

Se propone a los futuros docentes de Biología trabajar con programas y páginas web que permiten simular la electroforesis de ADN *in silico*, es decir, de manera virtual, lo que puede ser muy útil como complemento didáctico. LabXchange, <https://www.labxchange.org/>, es un simulador gratuito, muy útil para clases de introducción y complementarias a la práctica. Dentro de este simulador, [Gel Electrophoresis - LabXchange](#) permite simular de manera interactiva electroforesis en geles para aprendizaje y modificar algunos parámetros técnicos. Tiene tres niveles, para usuarios principiantes hasta avanzados en la técnica. Se puede realizar el proceso completo, desde la preparación del gel, la corrida electroforética, y observación del gel. Además de pensarse como una actividad complementaria para los estudiantes, también puede pensarse como un único recurso en el caso de que los futuros docentes no cuenten con laboratorios preparados para llevar a cabo este tipo de técnicas.

Fecha de entrega: próxima clase de Taller n.º 3. Los mapas conceptuales elaborados deberán ser entregados en la sección correspondiente denominada *Actividades Taller TP n.º 2* del aula virtual en un archivo Word conteniendo una carátula con los integrantes del grupo.

TRABAJO PRÁCTICO n.º 2: VISUALIZACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL ADN EXTRAÍDO

La evaluación de la cantidad y calidad de los ácidos nucleicos extraídos en el TP anterior se realizará por:

- electroforesis en geles de agarosa
- método espectrofotométrico

Protocolo de electroforesis en geles de agarosa

Equipamiento y materiales

- Fuente de poder
- Cuba para electroforesis
- Cables de conexión
- Matraces capaces de contener las soluciones
- Balanza analítica
- Probetas capaces de medir los volúmenes requeridos
- Micropipetas automáticas
- Puntas (*tips*) azules y amarillas
- Transiluminador UV
- ADN extraído en el TP n.º 1

Reactivos

- Agarosa en polvo
- Tampón de corrida TBE 1 X (o el tampón seleccionado)
- Tampón de carga (*loading buffer*)
- Solución de bromuro de etidio
- Marcador de peso molecular (*ladder*)

Preparación de soluciones de trabajo

- GelRed 1X:
Diluir a 1X, comercialmente se lo suministra a 10.000X
- TBE 10X (pH 8,2- 8,4)
Tris base 108 g
EDTA 9,25 g
Ácido bórico 55 g
Agua destilada c.s.p. 1000 mL

Ajustar el pH con ácido bórico. Esterilizar y conservar a 4 °C.

- TBE 1X:
TBE 10X 10 mL
Agua destilada 90 mL
- Gel de agarosa 1 %:
Agarosa 0,6 g
TBE 1X 60 mL

Si se tiñe el gel antes de la corrida electroforética, el colorante intercalante que se use se añadirá en la preparación del gel. En este TP se utiliza el GelRed a una concentración de 1X. En caso de utilizar el bromuro de etidio como colorante, se trabaja con una solución madre de 10 mg/mL.

Procedimiento

Preparación del gel de agarosa:

1. Sellar el soporte de corrida, donde se colocará la solución del gel de agarosa que gelificará posteriormente.
2. Diluir el *buffer* de corrida TBE de 10X a 1X.
3. Pesar la agarosa 1 %. En este TP se realizará un gel chico por lo que se preparará 60 mL; pesar 6 g de agarosa y disolver en *buffer* TBE 1 X dentro de un matraz. Fundir a baño María o en horno microondas (evitar que hierva), hasta obtener una solución límpida y homogénea.
4. Enfriar hasta unos 45 °C aproximadamente.
5. Si se desea teñir el gel antes de la corrida, agregar en este momento el colorante intercalante que tiñe el ADN. Esto es así cuando se trabaja con bromuro de etidio; se agregan 5 µL de una solución de 10 mg/mL. Sin embargo, en este TP se trabaja con GelRed y se agrega en el *buffer* de carga cuando se preparan las muestras para sembrar.
6. Verter la agarosa al soporte y colocar el peine procurando que su extremo inferior quede a 1 cm de la base.
7. Esperar a que la solución gelifique para retirar los selladores y colocar el soporte en la cuba.
8. Llenar la cuba con el *buffer* de corrida TBE 1X y luego retirar el peine con cuidado de no romper los pocillos formados.

Preparación de las muestras y electroforesis:

9. Mezclar 5 μL de cada muestra a analizar con 1 μL de *buffer* de carga. En este TP el *buffer* de carga tiene el colorante intercalante GelRed a 1X.
10. Sembrar la mezcla (muestra con el *buffer*) en el gel.
Nota: es importante mantener la micropipeta en posición vertical sobre el pocillo, con la punta del *tip* amarillo en la entrada (no en el fondo) del pocillo y depositar la muestra despacio. Evitar pinchar el fondo del pocillo con el *tip* ya que la muestra escurriría por debajo del gel de agarosa y se perdería.
11. Una vez cargadas todas las muestras, depositar 2 μL de patrón de peso molecular. Algunos patrones de peso molecular son provistos listos para usar; otros deben prepararse como si fueran una muestra más (mezclando con 1 μL de *buffer* de carga). En el TP el *buffer* de carga tiene el colorante intercalante GelRed a 1X, por lo cual se debe proceder de la misma forma que con la muestra, para que la corrida sea uniforme.
12. Calcular el voltaje que hay que fijar en la fuente de electroforesis para migrar el gel a 6 V/cm (la distancia es la que separa los dos electrodos). Conectar la fuente a la cuba de electroforesis e iniciar la corrida electroforética. En este TP se realizará la corrida electroforética a 100 – 120 V por 20 minutos.
13. Detener la corrida cuando el frente (indicado por el azul de bromofenol) haya llegado a los $\frac{3}{4}$ de la longitud del gel. En este caso, como se tiñó el gel antes de la corrida electroforética, el bromuro de etidio tiñó el ADN mientras migró.
14. Colocar el gel en el transiluminador bajo luz UV. Analizar las bandas coloreadas de naranja intenso con el bromuro de etidio.
15. Registrar la corrida mediante fotografía y guardar dicho registro con los datos indicados: nombre del usuario, fecha y muestras presentes en cada carril.

Protocolo del método espectrofotométrico

Equipamiento

- Espectrofotómetro
- Micropipetas automáticas
- Puntas (*tips*) azules y amarillas
- Microtubos de 1,5 mL
- Agua destilada estéril
- ADN extraído en el TP n.º 1

Procedimiento

1. Realizar una dilución 1/50 del ADN extraído. Para ello, se mezclarán 10 μL de la muestra de ADN con 490 μL de agua destilada estéril. Resuspender para mezclar bien.
2. Medir la absorbancia de la muestra a 260 y 280 y registrar los valores. Cuidar de no tirar la muestra entre una medición y la otra.
3. Calcular la concentración del ADN, utilizar el valor de absorbancia a 260 nm y las siguientes ecuaciones:

$$C_{\mu\text{g}/\text{mL}} = A_{260}/(\epsilon \cdot d)$$

$$C_{\mu\text{g}/\text{mL}} = 0,264 / (0,027 \text{ mL}/\mu\text{g} \cdot \text{cm} \times 1 \text{ cm})$$

o

$$C_{\mu\text{g}/\text{mL}} = A_{260} \cdot k$$

$$C_{\mu\text{g}/\text{mL}} = A_{260} \cdot 50 \mu\text{L}$$

4. Calcular la pureza del ADN, utilizar los valores de absorbancia a 260 y 280 nm y la relación entre ambas: $\text{Abs}_{260}/\text{Abs}_{280}$.

Reflexión para la práctica docente

La práctica de visualización y cuantificación de ADN constituye un espacio clave en la formación de los futuros profesionales de la biología, ya que permite vincular los conocimientos teóricos sobre ácidos nucleicos con técnicas experimentales concretas. A través de la electroforesis en gel de agarosa, los estudiantes pueden observar directamente la separación de fragmentos de ADN en función de su tamaño, comprendiendo la relevancia de variables experimentales como el porcentaje de agarosa, la intensidad del voltaje y la calidad de las muestras. Al mismo tiempo, la cuantificación mediante espectrofotometría brinda la posibilidad de estimar con precisión la concentración y la pureza del ADN, fundamentos indispensables para la correcta aplicación de metodologías posteriores como PCR, clonación o secuenciación.

Como docentes, es importante resaltar que estas experiencias no solo tienen un valor instrumental, sino también formativo. Por un lado, los estudiantes aprenden a manejar cuidadosamente muestras biológicas y equipos de laboratorio, desarrollando destrezas técnicas. Por otro lado, adquieren un sentido crítico al comparar la calidad de los resultados obtenidos con los esperados, valorando la importancia de la rigurosidad experimental y de los controles adecuados. El fin último es tomar decisiones informadas sobre el diseño de experimentos posteriores, entendiendo que la Biología Molecular se construye a partir de la suma de técnicas complementarias, y que la calidad de cada paso influye directamente en la validez y reproducibilidad de las conclusiones científicas.

BIBLIOGRAFÍA

- Cariaga Martínez, A. & Zapata, P. D. (2007). El laboratorio de Biología Molecular. Edición ampliada. Editorial Universitaria de Misiones.
- Gel electrophoresis | DNA Separation & Analysis | Britannica
<https://www.britannica.com/science/gel-electrophoresis> (Consultado: 15/09/2025).
- Gel Electrophoresis. LabXchange.
https://www.labxchange.org/library/items/lb:LabXchange:9548bee3:lx_simulation:1
(Subido 15/07/2019; actualizado 18/12/2024; consultado: 23/09/2025).

CAPÍTULO 2. GENÓMICA

La genómica, entendida como el estudio integral de la organización, función, regulación y evolución del genoma, se sustenta en principios fundamentales de la biología celular y de la genética clásica. Antes de abordar el análisis global de secuencias, la arquitectura cromosómica o las tecnologías de alto rendimiento, resulta imprescindible revisar los procesos y conceptos que constituyen la base conceptual del comportamiento del material genético.

CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL GENOMA

El genoma es el conjunto total del material genético hereditario presente en la célula, tanto nuclear como extranuclear, codificante o no. Puede estar en el núcleo, en mitocondrias y en cloroplastos. Se puede medir el genoma según su tamaño en pares de base. También, se lo puede estudiar según el número de cromosomas y el valor C, este último se define como la cantidad de ADN por genoma haploide. En nuestro caso, organismos diploides, el valor C es la cantidad correspondiente de ADN a un juego de 23 cromosomas.

El genoma humano tiene $3,2 \times 10^9$ pb = 3,2 Gpb

pb = pares de bases

kpb (o kb) = mil pb

Mpb (o Mb) = un millón de pb

Gpb (o Gb) = mil millones de pb

El genoma, en la mayoría de los organismos conocidos, está en forma de ADN de doble cadena. Sin embargo, hay algunas excepciones como los virus que tienen su genoma en forma de ARN, que es monocatenario. Algunos ejemplos de estos son el coronavirus y el virus de la inmunodeficiencia humana.

ESTRUCTURA Y ORGANIZACIÓN DEL GENOMA PROCARIOTA

En los organismos procariotas, el genoma se organiza generalmente como uno o más replicones de ADN bicatenario, localizados en una región citoplasmática denominada nucleoide. El replicón principal corresponde al cromosoma bacteriano, que en muchas especies es circular, aunque existen numerosas excepciones. Además del cromosoma, es frecuente la presencia de plásmidos, moléculas de ADN extracromosómico que se replican de manera independiente y pueden aportar funciones adaptativas, como resistencia a antibióticos o nuevas capacidades metabólicas.

En numerosas bacterias, la progresión del ciclo celular está estrechamente acoplada a la replicación cromosómica, de modo que la duplicación del ADN, el crecimiento celular y la división ocurren de forma coordinada. La ausencia de una envoltura nuclear implica que los procesos de replicación, transcripción y traducción pueden ocurrir simultáneamente, lo que permite respuestas rápidas a cambios ambientales.

En bacterias modelo como *Escherichia coli*, la replicación comienza en un único origen denominado oriC, que constituye el evento central del ciclo celular bacteriano. A partir de este origen se establecen dos horquillas de replicación que progresan en direcciones opuestas hasta completar la duplicación cromosómica. Este proceso integra señales metabólicas y ambientales en la replicación del ADN y su posterior segregación hacia las células hijas.

El genoma procariota suele presentar una organización compacta y funcionalmente densa, caracterizada por una alta proporción de secuencias codificantes y por la frecuente presencia de operones policistrónicos, que permiten la expresión coordinada de genes funcionalmente relacionados. Un operón es una unidad de transcripción procariota formada por varios genes estructurales controlados por un mismo promotor y regulados de manera coordinada, que se transcriben en un único ARN mensajero policistrónico. Estos genes suelen codificar proteínas que participan en una misma ruta metabólica o proceso celular, lo que permite su regulación coordinada. El ejemplo más conocido es el operón lac de *E. coli*, que contiene los genes necesarios para metabolizar lactosa. Cuando la lactosa está presente en el medio, los genes del operón se activan y la bacteria puede utilizar este azúcar como fuente de carbono.

Esta organización favorece una regulación transcripcional eficiente y rápida, compatible con ciclos celulares breves y con una elevada capacidad adaptativa. En este contexto, la topología del ADN, incluyendo el superenrollamiento, y la acción de topoisomerasas y proteínas asociadas al nucleoide desempeñan un papel esencial en la replicación y segregación cromosómica.

Revisión del modelo clásico del genoma bacteriano

Tradicionalmente, el genoma bacteriano se describió como un único cromosoma haploide, circular, desnudo y desestructurado. Esta visión surgió a partir de las primeras observaciones mediante microscopía electrónica, en las cuales el ADN aparecía como una región de menor densidad electrónica dentro de la célula correspondiente al nucleoide mientras que las regiones más densas correspondían principalmente a ribosomas. Estas imágenes llevaron inicialmente a interpretar el genoma bacteriano como una estructura poco organizada.

Los avances en genética molecular, microscopía y secuenciación genómica han demostrado que esta visión es incompleta y, en varios aspectos, incorrecta.

En primer lugar, no todas las bacterias poseen un único cromosoma. Los estudios genómicos indican que una fracción significativa de bacterias (entre el 5 y el 15 %) presenta dos o más cromosomas. En estos organismos, los distintos cromosomas contienen genes esenciales y se replican de manera coordinada durante el ciclo celular. Este tipo de organización se observa, por ejemplo, en especies de los géneros *Vibrio*, *Burkholderia*, *Cupriavidus*, *Ralstonia* y *Azospirillum*.

En segundo lugar, tampoco es correcto afirmar que todas las bacterias son estrictamente haploides. Los primeros estudios realizados en bacterias modelo como *Bacillus subtilis* y *E. coli* sugerían la presencia de una única copia cromosómica por célula debido a la estrecha relación entre replicación y división celular. Sin embargo, en muchos procariontes los procesos de replicación y división pueden estar desacoplados, lo que permite la existencia de células poliploides. Este fenómeno se observa, por ejemplo, en algunas cianobacterias, donde pueden encontrarse células con múltiples copias del cromosoma.

Un caso extremo de poliploidía se observa en bacterias gigantes como *Epulopiscium fishelsoni*, un simbiote intestinal de peces cirujano que puede alcanzar tamaños cercanos a 0,3 mm y contener miles de copias de su genoma. En general, se ha observado que un mayor número de copias cromosómicas suele asociarse con un mayor volumen celular.

En tercer lugar, aunque la mayoría de los cromosomas bacterianos son circulares, existen bacterias con cromosomas lineales. Ejemplos conocidos incluyen especies de los géneros *Borrelia* y *Streptomyces*. Además, algunas bacterias presentan simultáneamente diferentes topologías cromosómicas. Por ejemplo, *Agrobacterium tumefaciens* posee varios replicones que incluyen cromosomas circulares y lineales. En ciertas espiroquetas también pueden encontrarse cromosomas lineales acompañados de numerosos plásmidos, algunos circulares y otros lineales.

Estructura y compactación del ADN bacteriano

Contrariamente a la idea tradicional, el ADN bacteriano no está desnudo ni desestructurado, sino que presenta un alto grado de organización. El cromosoma bacteriano debe compactarse de manera eficiente dentro de la célula. Por ejemplo, el ADN de una célula típica de *E. coli* mide aproximadamente 1,6 mm de longitud, mientras que la célula tiene solo entre 1 y 4 μm de largo, lo que implica un nivel de compactación superior a mil veces.

La compactación del ADN depende tanto de las propiedades fisicoquímicas del citoplasma como de mecanismos moleculares específicos. Entre ellos se destacan: el superenrollamiento del ADN, regulado principalmente por topoisomerasas; las proteínas asociadas al nucleoide (NAPs, del inglés *Nucleoid-Associated Proteins*), que organizan el ADN en dominios estructurales; las proteínas condensinas, especialmente los complejos de mantenimiento estructural de cromosomas (SMC, del inglés *Structural Maintenance of Chromosomes*), que participan en el mantenimiento estructural y la correcta segregación cromosómica.

A diferencia de los eucariotas, estas proteínas no forman nucleosomas típicos, aunque cumplen funciones análogas en la organización y compactación del ADN. El nucleoide constituye una estructura dinámica, cuya organización cambia a lo largo del ciclo celular y en respuesta a las condiciones ambientales.

Variabilidad genética y concepto de pangenoma

El desarrollo de las técnicas modernas de secuenciación masiva ha revelado que dentro de una misma especie bacteriana puede existir una considerable variabilidad genética. A medida que se secuencian nuevas cepas, aparecen genes que no estaban presentes en los primeros genomas analizados.

Como resultado, surgieron nuevos conceptos para describir la composición genética de las especies bacterianas:

El genoma núcleo (del inglés *core genome*) corresponde al conjunto de genes presentes en todas las cepas de una especie, que generalmente codifican funciones esenciales.

El genoma accesorio o flexible incluye los genes que no están presentes en todas las cepas y que suelen asociarse con la adaptación ecológica, virulencia o resistencia a antibióticos.

El pangenoma corresponde al conjunto formado por el genoma núcleo más el genoma accesorio, es decir, todos los genes identificados en las distintas cepas de una especie.

Este enfoque permite comprender la diversidad genética dentro de las especies bacterianas y explica por qué distintas cepas pueden presentar propiedades fisiológicas y ecológicas diferentes.

El conocimiento actual indica que los genomas procariotas presentan una notable diversidad en cuanto al número de cromosomas, ploidía, topología y organización estructural. Aunque muchas bacterias poseen un único cromosoma circular, existen numerosas excepciones que incluyen cromosomas múltiples, cromosomas lineales y estados poliploides.

El cromosoma bacteriano constituye una estructura altamente organizada y dinámica, asociada a proteínas y regulada por mecanismos topológicos específicos. Esta organización permite una replicación eficiente del ADN y una rápida adaptación a condiciones ambientales cambiantes, características fundamentales de los organismos procariontes.

ORGANIZACIÓN DIFERENCIAL DEL GENOMA PROCARIOTA Y EUCARIOTA

De lo anterior, se puede concluir que el genoma procarionte se distingue por su alta densidad de información y una notable optimización del espacio genético. Sus características principales incluyen:

- Haploidía y especificidad: en la mayoría de las bacterias, la mayor parte del ADN se presenta en una única copia (estado haploide) y está dedicada de manera casi exclusiva a la codificación de productos génicos funcionales (proteínas y diversos tipos de ARN).
- Densidad codificante: aproximadamente el 99 % del genoma es codificante, lo que implica una presencia mínima de secuencias intergénicas no funcionales o intrones.
- Baja redundancia: existe una ausencia casi total de secuencias repetitivas, a diferencia de los genomas complejos de organismos superiores.
- Los genes están organizados en operones.

En contraste, en células eucariotas la organización del genoma adquiere un nivel superior de complejidad estructural y regulatoria. El genoma puede ser nuclear o extranuclear. El genoma nuclear es lineal y se encuentra dentro del núcleo. El genoma extranuclear en las mitocondrias y en los cloroplastos es circular, similar a los procariontes, lo cual se explica por su origen evolutivo.

El ADN lineal se distribuye en múltiples cromosomas contenidos en el núcleo y se asocia íntimamente a histonas formando cromatina. Esta organización jerárquica, desde el nucleosoma hasta dominios topológicamente asociados (TADs) y territorios cromosómicos, no solo permite el empaquetamiento de grandes cantidades de información genética, sino que establece un marco espacial que regula la accesibilidad génica. Durante el ciclo celular eucariota, particularmente en las fases S y M, la estructura cromatínica experimenta modificaciones dinámicas: la replicación del ADN implica la duplicación coordinada de histonas y la preservación de marcas epigenéticas, mientras que la mitosis se caracteriza por la condensación extrema de los cromosomas mediada por complejos como cohesinas y condensinas. Así, la arquitectura cromosómica no es estática, sino que se reorganiza de manera cíclica para asegurar

tanto la fidelidad en la transmisión de la información genética como la adecuada regulación transcripcional en interfase.

La organización de los genes es diferente en procariotas y eucariotas. Existe una diferenciación en la organización génica de operones vs. unidades monocistrónicas. La regulación de las vías metabólicas presenta estrategias divergentes entre dominios biológicos, como se ilustra en la síntesis del aminoácido triptófano (**Figura 2.1**).

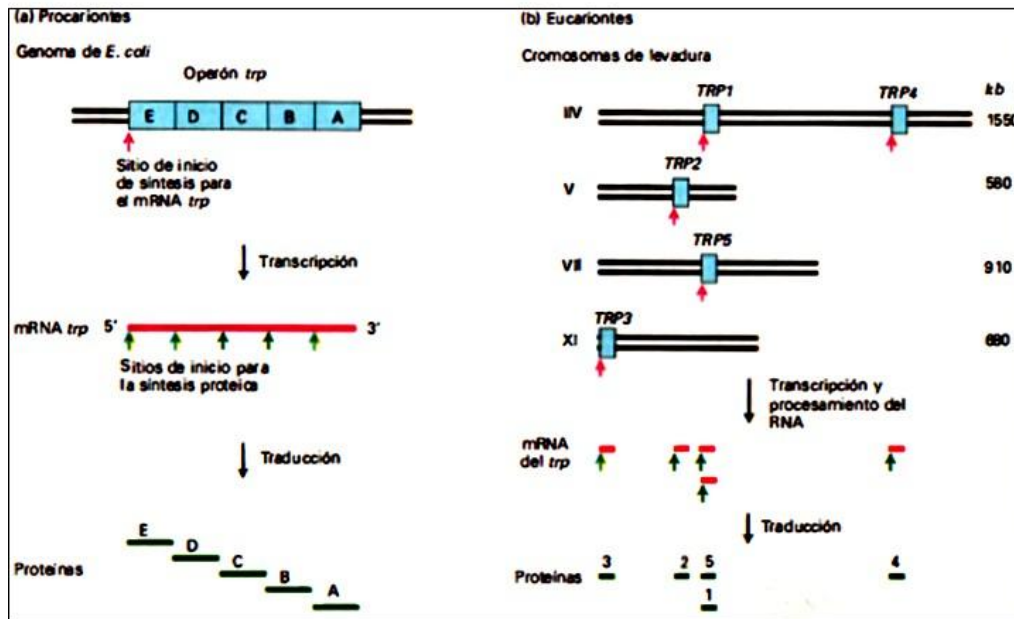


Figura 2.1. La organización de los genes es diferente en procariotas (a) y eucariotas (b). Tomado de Lodish *et al.* (2016) *Molecular Cell Biology* 7ma edición.

En organismos como *E. coli*, los genes funcionalmente relacionados se agrupan en unidades transcripcionales denominadas operones (**Figura 2.1a**). Existe una transcripción policistrónica donde el operón triptófano posee un único promotor y sitio de inicio de transcripción. Esto resulta en la síntesis de un solo ARNm policistrónico que contiene la información de múltiples genes en un bloque continuo. A pesar de transcribirse conjuntamente, cada segmento del ARNm posee sus propios sitios de unión al ribosoma, permitiendo la síntesis de proteínas individuales de manera coordinada pero físicamente separada.

En contraste, los eucariotas presentan una organización fragmentada e individualizada. Se organiza en unidades transcripcionales monocistrónicas, cada gen posee sus propios elementos reguladores (promotor y terminador). La transcripción de un gen es un evento independiente del resto. Tomando como ejemplo la levadura, los genes implicados en la vía del triptófano no están agrupados; se localizan en diferentes cromosomas (**Figura 2.1b**). Cada transcrito primario

es procesado individualmente (adición de caperuza 5', poliadenilación y *splicing*) antes de ser exportado al citoplasma para su traducción y cada uno de los genes puede estar incluso en cromosomas diferentes.

Mientras que los procariontes maximizan la eficiencia mediante la regulación cotranscripcional de genes agrupados, los eucariotes emplean una regulación más compleja y compartimentada, donde la expresión de vías metabólicas comunes depende de mecanismos de control coordinados a través de diversos loci cromosómicos.

GENÓMICA ESTRUCTURAL, FUNCIONAL Y COMPARATIVA

La genómica es el conjunto de estrategias y tecnologías empleadas para la caracterización del genoma. Existe la genómica estructural, la funcional y la comparativa.

La genómica estructural corresponde al estudio de las técnicas y estrategias necesarias para obtener mapas físicos (organización del genoma procarionte y eucariote). Esta genómica trata de responder a las preguntas: ¿Cuántos genes hay? ¿Dónde están los genes? ¿Cómo puedo identificarlos o rastrearlos? ¿Puedo modificar su estructura?

La genómica funcional o proteómica se aboca a la caracterización del conjunto de todas las proteínas originadas por el genoma, llamado proteoma. Estudia la función de genes procariontes y eucariotes. Esta genómica responde a las preguntas: ¿Qué producto génico codifica y cómo lo reconozco? ¿Cómo funciona y qué estructura posee? ¿De qué depende su expresión? ¿Puedo manipular la expresión y la estructura del producto?

La genómica comparativa estudia las semejanzas y diferencias entre genomas de diferentes organismos. En este contexto, compararemos los genomas de algunos organismos. El genoma humano tiene 3.200 Mb o Mpb y se estima que el número de genes es aproximadamente 30.000. La *Arabidopsis thaliana*, planta muy usada como modelo de estudio, tiene 125 Mpb y alrededor de 25.500 genes. El tamaño de su genoma es inferior al nuestro y, sin embargo, tiene casi la misma cantidad de genes.

El segundo genoma más pequeño, considerado como el genoma mínimo para vivir es el *Mycoplasma genitalium* que tiene 0,58 Mpb y tiene 500 genes. Del estudio de varios genomas, se pudo deducir que: no existe una correlación entre el tamaño del genoma de las distintas especies y el número de cromosomas. En la **Figura 2.2** se observa que no existe correlación entre el número de cromosomas y el tamaño del genoma (en pb) de los organismos. Por ejemplo, la especie humana tiene 46 cromosomas, en contraste, la cebolla tiene menos cromosomas, pero

un genoma más grande. Esto evidencia que el número de cromosomas no se encuentra relacionado de modo directo con el tamaño del genoma.

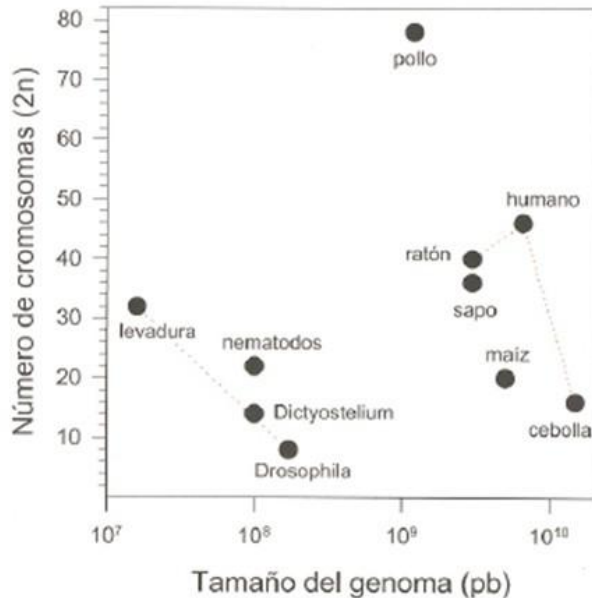


Figura 2.2. Gráfico de dispersión del número de cromosomas y el tamaño del genoma de distintos organismos. No existe correlación entre estas dos variables.

En relación con lo profundizado anteriormente, se puede concluir que:

- Las especies cercanas no poseen el mismo número de genes.
- Los mamíferos poseen un número de genes similar.
- Existe ADN no transcrito en un alto porcentaje; es decir, el ADN que no se transcribe a ARNt, ni ribosomal, ni mensajero.
- Hay intrones cortos en genes que están muy expresados.
- La diferencia entre especies es 1 %.
- La diferencia entre individuos es 0,1 %.

PROYECTO GENOMA HUMANO

El Proyecto Genoma Humano (PGH) se estableció con el propósito fundamental de determinar la secuencia de pares de bases químicas que constituyen el ADN e identificar la totalidad de los genes del genoma humano (estimados entre 20.000 y 25.000). Esta iniciativa buscaba no solo la secuenciación, sino también el mapeo genético para determinar la ubicación cromosómica y la caracterización funcional de dichos genes.

Lanzado oficialmente en 1990, el proyecto fue coordinado por el Departamento de Energía (DOE) y los Institutos Nacionales de Salud (NIH) de los Estados Unidos. Su ejecución fue posible gracias a una convergencia tecnológica sin precedentes, particularmente en el ámbito del procesamiento computacional y la bioinformática, lo que impulsó aplicaciones innovadoras en diversas disciplinas científicas.

La ejecución del PGH representó un cambio de paradigma en la biotecnología. El proceso estuvo marcado por la coexistencia de dos esfuerzos paralelos: el consorcio público internacional y la iniciativa privada (liderada por *Celera Genomics*). Esta competencia aceleró los resultados, lográndose el primer borrador del genoma en el año 2000.

Uno de los puntos de mayor fricción académica y política fue la propiedad de los datos. Mientras algunos sectores abogaban por la patentabilidad de las secuencias, prevaleció la postura de que el genoma humano es patrimonio de la humanidad. Tras intensos debates éticos, se acordó la liberación de los datos, culminando con la presentación de la secuencia completa en abril de 2003.

En la actualidad, el acceso a esta información es universal a través de plataformas como el Centro Nacional para la Información de Biotecnología (NCBI, del inglés *National Center for Biotechnology Information*). Aunque la secuencia está disponible en su totalidad, la comunidad científica continúa trabajando en la anotación funcional de muchos segmentos. No obstante, se han logrado avances significativos en la identificación de variantes genéticas asociadas a patologías específicas, marcadores de susceptibilidad o predisposición a enfermedades complejas, correlaciones entre cambios en la secuencia de ADN y fenotipos clínicos, información que se actualiza constantemente en bases de datos de acceso público.

La democratización de los datos genómicos ha generado desafíos éticos persistentes. La posibilidad de acceder al perfil genético de un individuo plantea riesgos de discriminación genética en diversos ámbitos sociales. En el ámbito laboral, el uso de información genética para evaluar la idoneidad de un candidato basándose en predisposiciones patológicas futuras. En el sector asegurador, la potencial exclusión de individuos por parte de entidades de medicina prepaga u obras sociales debido a riesgos de salud preexistentes a nivel molecular.

Estos escenarios subrayan la necesidad de marcos regulatorios robustos que protejan la privacidad genética y eviten que el conocimiento científico se traduzca en nuevas formas de exclusión social.

El legado del PGH fue un cambio de paradigma. Su culminación en 2003 representó un hito en la comunicación científica, materializado en una publicación de referencia en la revista *Nature*. El liderazgo del proyecto fue fundamental para su éxito: si bien James Watson inició la dirección del consorcio, su renuncia motivada por divergencias estratégicas y su firme defensa de la naturaleza pública del genoma dio paso a la gestión de Francis Collins, quien supervisó la fase final de secuenciación y ensamblaje.

Las dimensiones y proyecciones de la genómica se basan en la arquitectura del PGH, considerado un cimiento robusto sobre el cual se han edificado múltiples pilares del conocimiento contemporáneo. Este desarrollo ha propiciado una convergencia interdisciplinaria en áreas críticas:

- Bioinformática y computación: la necesidad de procesar volúmenes masivos de datos impulsó el diseño de algoritmos avanzados de alineamiento y ensamblaje.
- Innovación tecnológica: evolución hacia técnicas de secuenciación de nueva generación (NGS).
- Educación y sociedad: transformación de los currículos científicos y de la percepción pública sobre la herencia biológica.

El impacto más directo del PGH se observa en el ámbito de la salud, donde la genómica ha permitido transitar hacia una medicina preventiva y personalizada a través de diversas modalidades de cribado:

- Diagnóstico presintomático: identificación de variantes patogénicas en individuos asintomáticos con el fin de establecer medidas profilácticas tempranas.
- Diagnóstico prenatal: análisis de material genético obtenido mediante técnicas invasivas (amniocentesis) o no invasivas para detectar anomalías congénitas.
- Diagnóstico genético preimplantacional: evaluación molecular de blastómeros o trofoblasto en embriones obtenidos por fertilización *in vitro* antes de su transferencia uterina.

ORGANIZACIÓN DEL GENOMA EUCARIOTA

Organización del genoma eucariota: ADN de copia única

En la organización del genoma eucariota coexisten secuencias de ADN únicas y repetitivas, regiones codificantes y extensas regiones no codificantes. A diferencia de los genomas procariotas, el genoma eucariota presenta una elevada proporción de ADN no codificante y una

disposición modular de sus unidades génicas. Del genoma, el 70 % del ADN es de copia única y el 30 % es de copia repetida. Asimismo, más del 98 % del genoma es ADN no codificante mientras que solamente el menos del 2 % es ADN codificante.

El ADN de copia única corresponde a secuencias presentes una sola vez o en muy bajo número de copias dentro del genoma haploide. Incluye la mayoría de los genes estructurales que codifican proteínas y muchas regiones reguladoras específicas. Estas secuencias suelen exhibir mayor complejidad y especificidad funcional, y son fundamentales para la identidad genética de la especie. En estudios de hibridación, este ADN se caracteriza por una cinética de reasociación lenta debido a su baja redundancia. La secuencia ATGA que aparece solamente una vez en el genoma es un ejemplo de copia única.

Dentro del ADN de copia única se encuentran secuencias codificantes, que forman parte de genes y secuencias no codificantes (**Figura 2.3**).

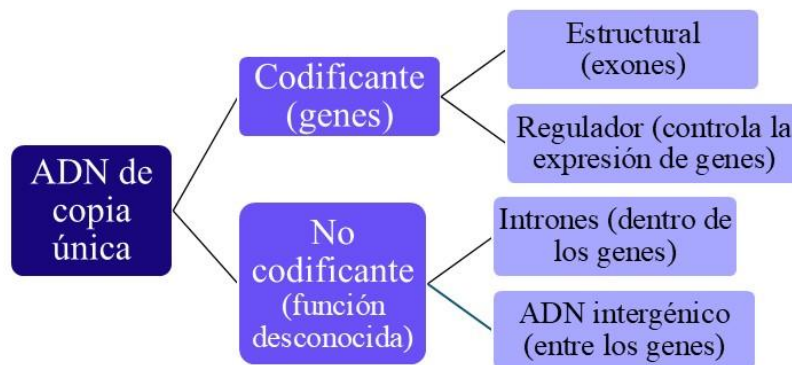


Figura 2.3. Esquema de organización del ADN de copia única en genomas eucariotas.

Organización del genoma eucariota: ADN codificante y no codificante en los genes

El ADN codificante comprende las regiones génicas que se transcriben y traducen en proteínas. En el contexto de un gen eucariota, se refiere específicamente a los exones. En términos cuantitativos, el ADN estrictamente codificante representa una fracción relativamente pequeña del genoma total en la mayoría de los eucariotas. En el genoma humano, representa apenas entre el 1 % y el 2 % del total. Estas regiones tienden a estar altamente conservadas (cambian poco entre especies), ya que cualquier mutación suele alterar la función de la proteína y puede ser letal o patogénica.

El ADN no codificante es el conjunto de secuencias que no se traducen en proteínas. Sin embargo, su importancia es vital para la arquitectura cromosómica y la regulación genética. Comprende los intrones, regiones reguladoras (promotores, potenciadoras y silenciadores),

elementos estructurales (telómeros y centrómeros) y ARN funcionales. Estos últimos son segmentos que codifican moléculas de ARN que nunca serán proteínas, pero tienen funciones propias, como el ARN de transferencia (ARNt), el ARN ribosomal (ARNr) y los microARN (miRNA).

En los genomas eucariotas, la relación entre ADN codificante y no codificante se articula directamente con la organización funcional del gen, que no se limita a la secuencia que determina una proteína, sino que incluye también regiones reguladoras esenciales para su correcta expresión. Estructuralmente, un gen es un segmento de ADN que contiene las instrucciones necesarias para la síntesis de un producto funcional, como ARN o proteína, y se divide en dos grandes regiones: la región reguladora y la región estructural (**Figura 2.4**).

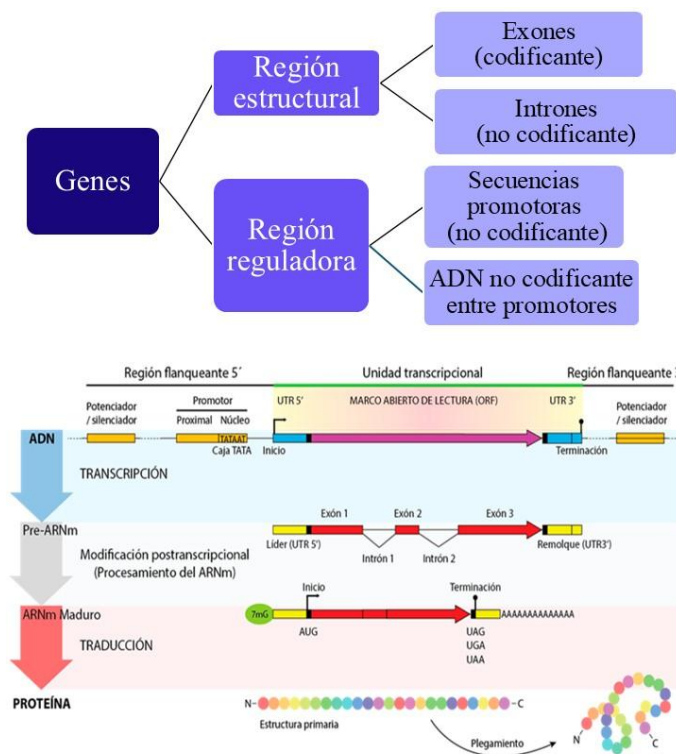


Figura 2.4. Esquema de la organización del ADN codificante y no codificante en la región estructural y reguladora de un gen.

La región estructural contiene la secuencia de nucleótidos que se traducirá en aminoácidos de una proteína o en la secuencia de un ARN funcional. Está conformada por exones, intrones y el sitio de terminación. Los exones son secuencias codificantes que permanecen en el ARNm maduro tras el procesamiento. Contienen la información biológica que el código genético interpretará. Los intrones son secuencias no codificantes intercaladas entre los exones. Aunque se transcriben inicialmente (pre-ARNm), se eliminan mediante el proceso de *splicing* (corte y empalme). Su presencia permite mecanismos como el *splicing* alternativo, que permiten que un

solo gen genere múltiples proteínas. Existe una relación entre la longitud intrónica y la eficiencia transcripcional. Se observa una correlación inversa entre el nivel de expresión génica y la longitud de los intrones. Esta organización genómica responde a un principio de economía metabólica y optimización cinética. La transcripción de intrones extensos requiere un elevado gasto de nucleótidos trifosfato (ATP/GTP). En genes con alta tasa de transcripción, la reducción del tamaño intrónico minimiza el costo energético celular. Además, los intrones breves permiten una síntesis más rápida del transcrito primario (pre-ARNm), acelerando la disponibilidad de ARNm maduro en el citoplasma. El sitio de terminación es la secuencia que señala el final de la transcripción, lo que provoca la liberación de la cadena de ARN y el desensamblaje del complejo enzimático.

Por su parte, la región reguladora no se traduce en el producto final, pero determina dónde, cuándo y cuánto se expresa un gen. Es la encargada de coordinar la interacción con la maquinaria celular. Se conforma por promotores, potenciadores, silenciadores y regiones UTR (del inglés, regiones no traducidas). Los promotores son secuencias de ADN situadas corriente arriba (5') del sitio de inicio de la transcripción. Su función es servir de sitio de unión para la ARN polimerasa y los factores de transcripción generales. En eucariotas, destaca la caja TATA, esencial para el ensamblaje del complejo de iniciación. Los potenciadores (*enhancers*) y silenciadores (*silencers*) son elementos distales que pueden ubicarse a miles de pares de bases de distancia. Los potenciadores incrementan la tasa de transcripción al reclutar activadores, mientras que los silenciadores la reprimen. Las secuencias UTR-5' y UTR-3' se encuentran al principio y al final de la región estructural del gen, respectivamente. Estas secuencias se transcriben, forman parte del ARNm inmaduro y del ARNm maduro, pero no se traducen. La región líder UTR-5' es el segmento que se transcribe, pero no se traduce. Es crucial para la estabilidad del ARNm y el inicio de la traducción en el ribosoma.

Así, el gen puede concebirse como una unidad funcional compuesta por una región estructural codificante, responsable de la síntesis del producto, y una región reguladora no codificante, que modula su expresión. Esta organización refleja que la información genética no solo reside en la secuencia que codifica proteínas, sino también en los elementos que controlan cuándo, dónde y en qué cantidad esa información se expresa.

Los genes pueden existir en una única copia dentro del genoma o se pueden repetir (varias copias).

Organización del genoma eucariota: ADN repetitivo

El ADN repetitivo es una secuencia de ADN que se repite muchas veces a lo largo del genoma y puede aparecer agrupada o dispersa (**Figura 2.5**).

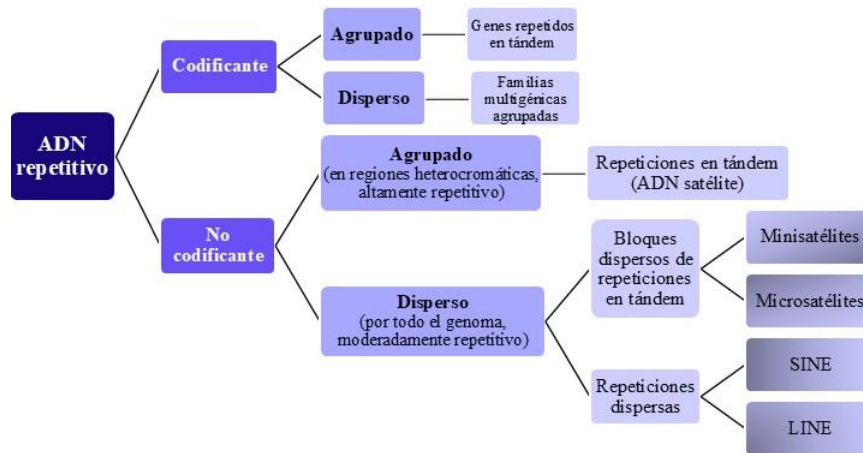


Figura 2.5. Esquema de organización del ADN repetitivo en genomas eucariotas.

El origen evolutivo de las repeticiones agrupadas pudo deberse a errores en la replicación o en la recombinación génica. Durante la replicación del genoma en la fase S, pueden ocurrir errores. Si estos errores no son corregidos, pasan a la siguiente generación. En contraparte, las repeticiones dispersas pueden haber surgido de translocaciones o trasposiciones cromosómicas.

Organización del genoma en eucariotas: ADN repetitivo codificante

Las familias génicas clásicas están constituidas por conjuntos de genes cuyas secuencias se encuentran altamente conservadas y se organizan estructuralmente en repeticiones en tándem (**Figura 2.6**). Este tipo de organización genómica es característica de genes cuyos productos son requeridos en grandes cantidades por la célula, como los genes que codifican para el ARNr y las proteínas histonas.

Continuando con el ejemplo de las histonas, estas son proteínas esenciales para el empaquetamiento del ADN en la cromatina. El complejo proteico involucra cinco tipos principales: H1, H2A, H2B, H3 y H4 (**Figura 2.6a**). En esta figura, en rojo se representa el gen y el ADN entre cada gen es ADN no codificante, llamado ADN intergénico. La organización en tándem de sus genes permite una respuesta celular eficiente, una transcripción simultánea donde cada copia génica dentro del bloque genera un transcrito independiente, lo que resulta en una producción masiva de ARN mensajero en un tiempo reducido. La existencia de múltiples copias es crítica durante la fase S. A medida que la replicación del ADN progresa, el nuevo genoma requiere un empaquetamiento inmediato; por lo tanto, la célula necesita una tasa de síntesis de

histonas extremadamente alta que no podría satisfacerse con un gen de copia única. En estas agrupaciones, los genes individuales están separados por regiones de ADN intergénico no codificante, el cual actúa como espaciador entre las unidades transcripcionales. Esta unidad (gen + espaciador) se reitera de forma consecutiva, conformando bloques que pueden repetirse entre 10 y 40 veces, dependiendo de la especie y las necesidades metabólicas del organismo.

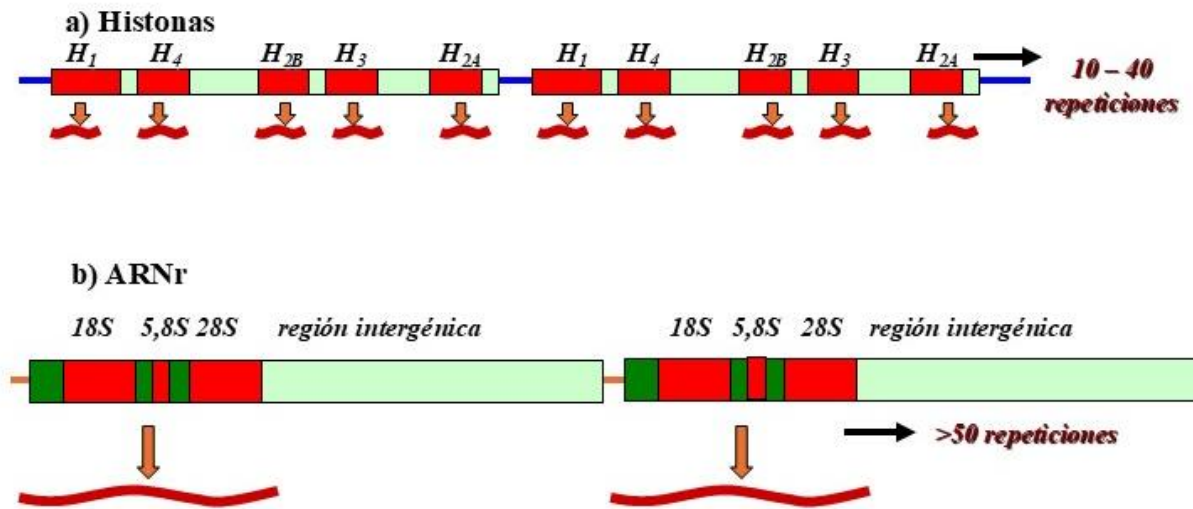


Figura 2.6. Esquemas de familias génicas clásicas. a) Familia génica de las histonas. b) Familia génica del ARNr.

En **Figura 2.6b** se puede observar otro ejemplo de familia génica clásica, del ARNr. En rojo se representan los genes que codifican para el ARNr 18S, 5,8S y 28S, separados por una región intergénica. Estos genes se transcriben en bloque, semejante a lo que ocurre en procariontes. Luego, cada transcrito dará origen a cada uno de los ARN ribosomales. Este bloque se repite más de 50 veces dependiendo del organismo.

Las familias multigénicas están compuestas por conjuntos de genes que derivan de un ancestro común mediante procesos de duplicación génica. A diferencia de las familias clásicas, estas presentan un grado de conservación variable. La relación de parentesco entre sus miembros se define según su homología. Las familias multigénicas poseen una alta homología de secuencia y conservan funciones estrechamente relacionadas. Las superfamilias presentan una baja homología, manteniendo apenas motivos estructurales comunes que sugieren un origen evolutivo remoto, aunque sus funciones hayan divergido significativamente. Tras la duplicación de un gen ancestral, las copias acumuladas pueden seguir distintos destinos evolutivos. Dentro de un clúster o agrupación génica, se distinguen los siguientes elementos:

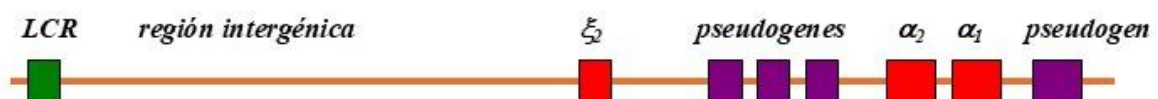
- Variantes génicas (copias funcionales): son las únicas secuencias que mantienen la capacidad de codificar proteínas funcionales. Aunque comparten una estructura básica,

suelen expresar ligeras variaciones que permiten una especialización fisiológica o temporal.

- Pseudogenes: secuencias con alta similitud a los genes funcionales, pero han perdido su capacidad de expresión o su funcionalidad debido a la acumulación de mutaciones (codones de parada prematuros, pérdida de promotores, etc.).
- Genes truncados: secuencias que conservan únicamente uno de los extremos del gen original (ya sea el extremo 5' o 3').
- Fragmentos génicos: porciones internas de la secuencia original que carecen de los elementos necesarios para una transcripción o traducción completa.

El sistema de las globinas humanas es el modelo clásico de evolución por duplicación y divergencia. Estas familias se encuentran organizadas en clústeres específicos. El clúster de la α -globina está localizado en el cromosoma 16. Este complejo genómico ilustra la coexistencia de elementos funcionales y no funcionales; por ejemplo, contiene tres variantes génicas funcionales (en rojo) que se expresan en distintas etapas del desarrollo y cuatro pseudogenes (en violeta) (**Figura 2.7a**). El clúster de la β -globina está situado en el cromosoma 11, presenta una organización similar que permite el cambio de hemoglobina embrionaria a fetal y, finalmente, a adulta. Tiene 5 variantes génicas (en rojo) y un pseudogen (en violeta) (**Figura 2.7b**). Estas familias multigénicas se encuentran agrupadas en el genoma.

a) Clúster de la α -globina ubicado en el cromosoma 16



b) Clúster de la β -globina ubicado en el cromosoma 11



Figura 2.7. Esquemas de familias multigénicas. a) Familia multigénica de la α -globina. b) Familia multigénica de la β -globina.

Existen otras familias multigénicas que se encuentran dispersas, incluso en diferentes cromosomas. Un ejemplo de este tipo de familias multigénicas es la familia de la aldolasa que tiene 3 genes funcionales y 2 pseudogenes repartidos en 4 cromosomas.

Organización del genoma eucariota: ADN repetitivo no codificante

Como se mencionó, el ADN no codificante constituye la mayor parte del genoma eucariota. Aunque no codifique proteínas, cumple funciones esenciales en la regulación génica, la organización cromosómica, la estabilidad estructural y la evolución genómica. Estas regiones no codificantes se organizan fundamentalmente en dos categorías: el ADN intergénico y el ADN repetitivo. El ADN intergénico comprende las secuencias localizadas entre los loci génicos adyacentes. El espacio genómico que separa el final de un gen del inicio del siguiente constituye el bloque intergénico (**Figura 2.8a**).

Dentro del ADN repetitivo no codificante, se encuentra el ADN altamente repetitivo agrupado en las regiones heterocromáticas y el ADN moderadamente repetitivo disperso a lo largo del genoma (**Figura 2.5**). Las secuencias agrupadas de ADN altamente repetitivo se caracterizan por presentar una unidad de repetición corta (de 2 a 50 pb) organizada en tándem, formando bloques masivos que pueden alcanzar de 10^3 a 10^6 unidades (**Figura 2.8b**). Se concentran en regiones de heterocromatina constitutiva, específicamente en centrómeros y telómeros, donde desempeñan funciones estructurales críticas para la estabilidad cromosómica y la segregación durante la división celular.

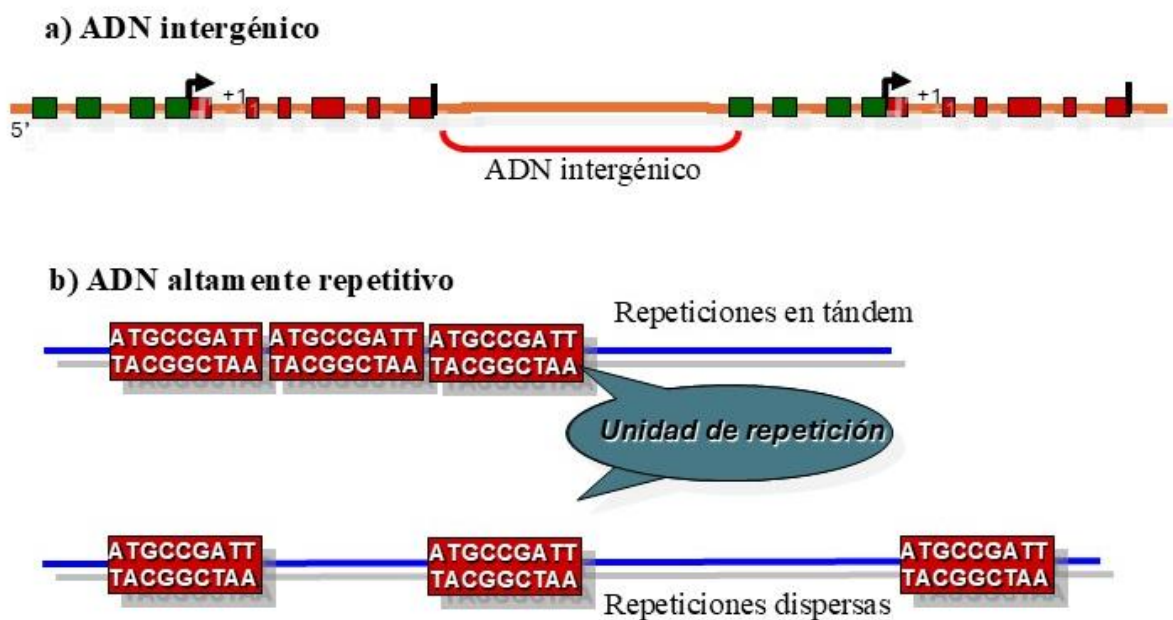
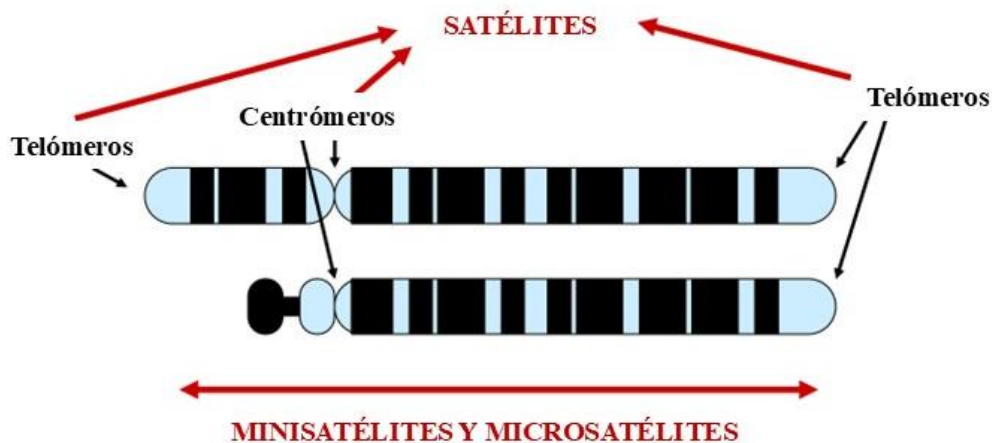


Figura 2.8. Esquema del ADN repetitivo no codificante. a) ADN intergénico. b) ADN altamente repetitivo agrupado o en tándem (satélites) y disperso.

Considerando el ejemplo de la **Figura 2.8b**, donde la secuencia ATGCCGATT es la unidad de repetición, esta secuencia puede repetirse y estar dispersa a lo largo del genoma o esta misma secuencia puede repetirse en tándem, una al lado de la otra. Este último es el caso de las secuencias satélites, secuencias altamente repetitivas que se encuentran agrupadas en regiones heterocromáticas en los centrómeros y telómeros de los cromosomas (**Figura 2.9a**). Los satélites están formados por bloques de 1.000 a 1.000.000 de unidades de repetición y cada unidad de repetición está conformada de 2 a 50 pb (**Figura 2.9b**).

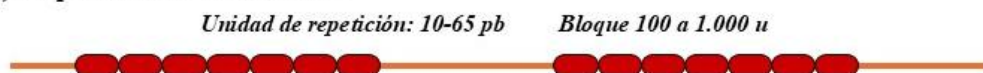
a) Ubicación de los satélites, minisatélites y microsatélites



b) Esquema de un satélite



c) Esquema de un minisatélite



d) Esquema de un microsatélite

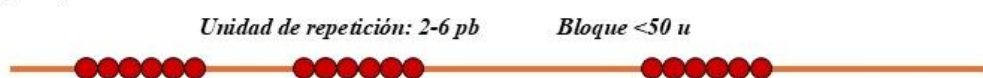


Figura 2.9. ADN altamente y moderadamente repetitivo. a) Localización en el genoma. b) Satélite. c) Minisatélite. d) Microsatélite.

Las secuencias de ADN moderadamente repetitivo se encuentran dispersas a lo largo del genoma y son fundamentales en la genética molecular debido a su polimorfismo. Pueden encontrarse como bloques de repeticiones en tándem o como secuencias repetidas, ambos dispersos por el genoma.

Dentro de los bloques de repeticiones en tándem se encuentran los minisatélites y los microsatélites. Los minisatélites (VNTR) son bloques de 100 a 1.000 unidades de repetición, cada unidad de repetición se compone de 10 a 65 pb (**Figura 2.9c**). Los microsatélites (STR) son bloques de 50 unidades de repetición y cada unidad de repetición tiene de 2 a 6 pb (**Figura 2.9d**). Al no estar sujetas a una presión selectiva directa, estas regiones son hipervariables en la población. Dado que los humanos somos organismos diploides, heredamos un alelo (número de repeticiones) de cada progenitor. Esta variabilidad permite realizar pruebas de paternidad y ensayos de genética forense con alta precisión.

En un ejemplo diagnóstico, se considera que un niño posee los alelos (5, 6) para un microsatélite específico y su madre es (5, 7), se infiere que el alelo 5 es de origen materno. Por consiguiente, el alelo 6 debe ser aportado por el padre biológico. Si un presunto progenitor presenta el genotipo (10, 12), queda excluido biológicamente como padre.

Con respecto a las secuencias repetitivas dispersas, se encuentran los elementos genéticos transponibles, SINE (del inglés *Short Interspersed Nuclear Elements*) y LINE (del inglés *Long Interspersed Nuclear Elements*). Estos tienen la capacidad (o la tuvieron evolutivamente) de movilizarse por el genoma. Los SINE tienen unidades de repetición de 100 a 500 pb con un número de copias variable y disperso. Los LINE tienen unidades de repetición extensas de varios miles de pares de bases, presentes en miles de copias distribuidas globalmente por el genoma (**Figura 2.10**).

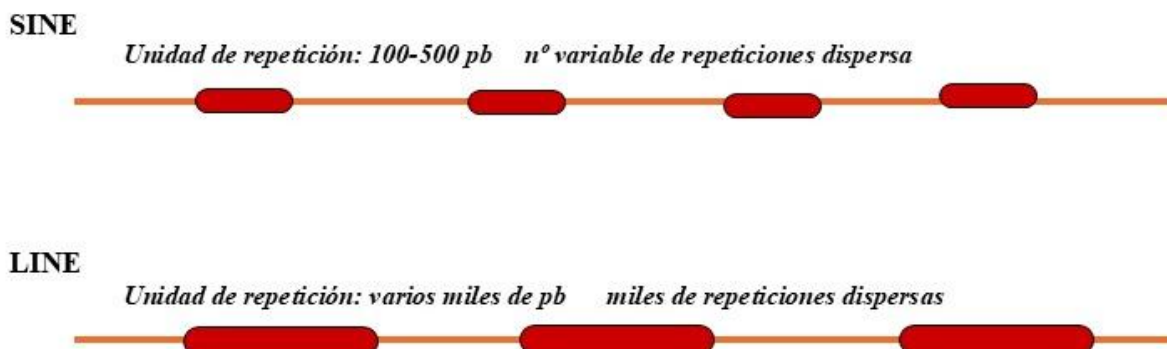


Figura 2.10. Secuencias repetidas dispersas.

Al analizar un segmento cromosómico humano representativo (**Figura 2.11**), se observa una clara preponderancia de elementos no codificantes (intrones, pseudogenes, SINE, LINE y microsatélites) sobre las secuencias exónicas. Esta arquitectura subraya que la complejidad biológica no reside únicamente en la cantidad de proteínas codificadas, sino en la vasta red regulatoria y estructural que compone el resto del genoma.

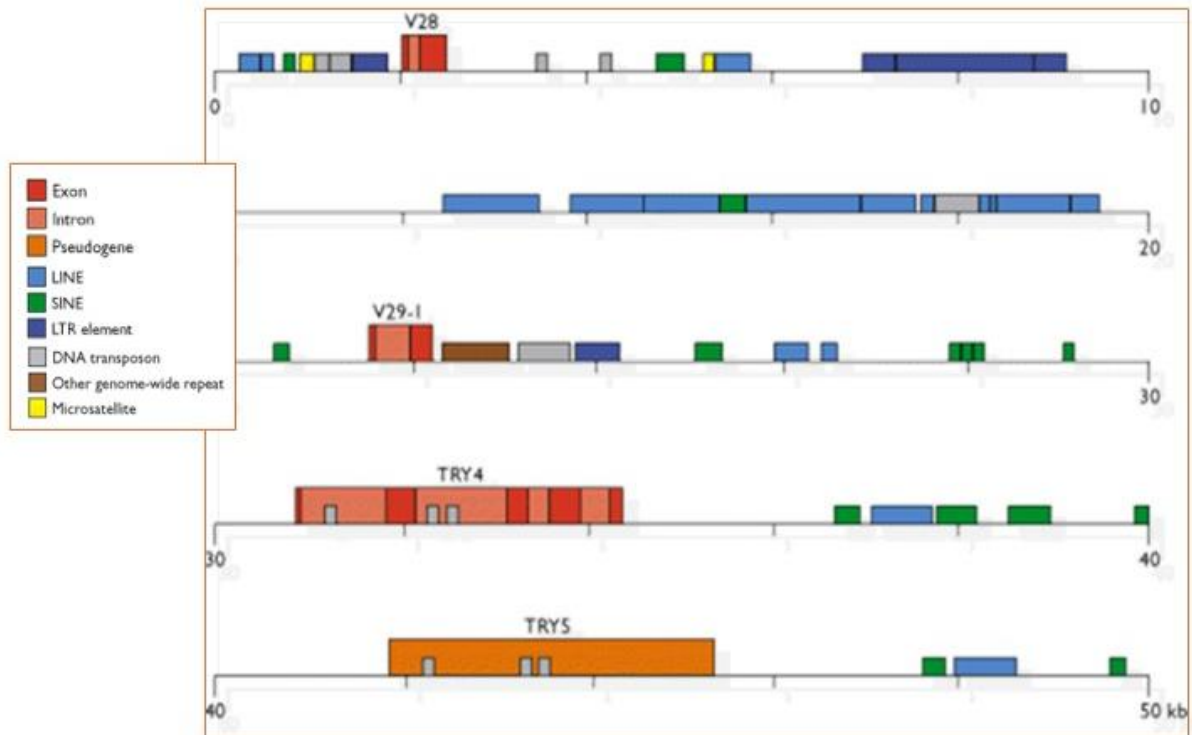


Figura 2.11. Fragmento de un cromosoma humano.

A modo de resumen, en la **Figura 2.12** se muestra una tabla que clasifica los componentes del genoma humano basándose en su frecuencia de repetición y su función biológica.

| | | | | | |
|------------------------|-----------------------|--|---|---|--|
| DNA copia única | Codificante | <i>estructural</i> | <i>Proteínas y RNA</i> | | |
| | | <i>regulador</i> | <i>Control de expresión</i> | | |
| | No codificante | <i>Intrones: DNA intragenico</i> | | | |
| | | <i>DNA intergénico</i> | | | |
| DNA repetitivo | Codificante | <i>agrupados</i> | <i>Genes repetidos de flia. génicas clásicas: histonas, rRNA</i> | | |
| | | | <i>Flías multigénicas con genes agrupados: globinas, HLA</i> | | |
| | | <i>dispersos</i> | <i>Flías. Multigénicas con genes dispersas: aldolasa, actina, ferritina</i> | | |
| | No codificante | <i>Agrupados y altamente repetitivos</i> | | <i>Repeticiones en tándem: DNA satélite</i> | |
| | | <i>Disperso y moderadamente repetitivo</i> | <i>Rep. Tándem dispersas</i> | <i>Minisatélites</i> | |
| | | | | <i>Microsatélites</i> | |
| | <i>Rep. dispersas</i> | <i>Retroelementos</i> | | | |
| | | <i>DNA transposones</i> | | | |

Figura 2.12 Resumen de los componentes del genoma humano basándose en su frecuencia de repetición y su función biológica. Tomado de Strachan & Read (1999).

CAPÍTULO 3. BASES MOLECULARES DE LA REPLICACIÓN

REPLICACIÓN DEL ADN: CARACTERÍSTICAS GENERALES

El ADN constituye el reservorio de la información genética de los organismos biológicos. La transferencia de este material hereditario desde una célula progenitora hacia su descendencia se efectúa mediante un mecanismo bioquímico rigurosamente regulado denominado replicación. En el contexto de la ontogénesis celular, este fenómeno de síntesis ocurre específicamente durante la fase S (síntesis) del ciclo celular, garantizando que el genoma se duplique con alta fidelidad antes de la división mitótica o meiótica.

A continuación, se describen las propiedades fundamentales que rigen el proceso de la replicación desde una perspectiva bioquímica y molecular.

- Naturaleza semiconservadora: la replicación se define como semiconservadora debido a que cada una de las dos moléculas de ADN resultantes conserva una de las hebras originales (hebra parental o molde), mientras que la hebra complementaria es sintetizada *de novo*. Este modelo asegura la continuidad de la secuencia de nucleótidos a través de las generaciones celulares. El modelo semiconservador fue propuesto originalmente por Watson y Crick y confirmado experimentalmente por Meselson y Stahl. En este mecanismo hay un desenrollamiento de la doble hélice, las dos hebras de la molécula de ADN original se separan, sirviendo cada una como un molde o plantilla. Luego, se produce la síntesis de hebras complementarias a partir de cada hebra parental. Como resultado final, cada una de las dos moléculas de ADN resultantes conserva una hebra íntegra de la molécula original (hebra parental) y una hebra de síntesis reciente (hebra hija). Esta característica es esencial para mantener la estabilidad genética, ya que minimiza el riesgo de errores en la secuencia de nucleótidos y asegura la continuidad de la información a través de las generaciones celulares.

- Origen de la replicación (puntos de iniciación): el inicio de la síntesis de ADN ocurre en secuencias nucleotídicas específicas denominadas orígenes de replicación. Existen diferencias críticas según el dominio biológico (**Figura 3.1**). En organismos procariontes con genoma circular existe un único origen de replicación (monofocal), denominado comúnmente *OriCN* (**Figura 3.1a**). En organismos eucariotes, debido a su ADN lineal y de gran extensión, presentan múltiples orígenes de replicación (multifocal). Esta organización permite que la duplicación del genoma ocurra de manera simultánea en diversos puntos, optimizando significativamente el tiempo del proceso (**Figura 3.1b**).

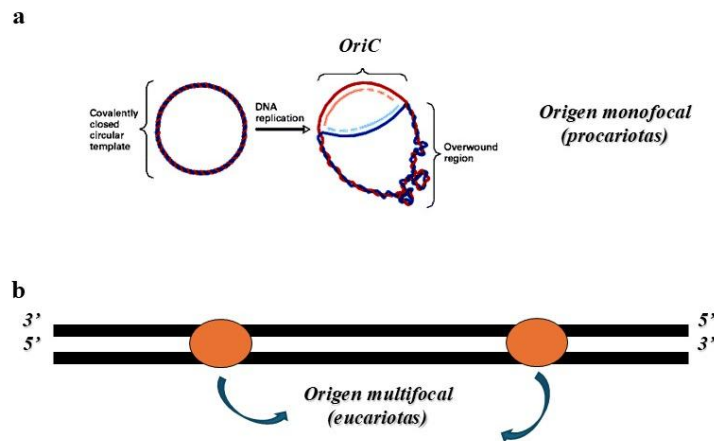


Figura 3.1. Origen de la replicación en procariotas (a) eucariotas (b).

- Dinámica simultánea y secuencial: la síntesis de las nuevas cadenas ocurre de forma simultánea en ambas hebras molde. Asimismo, es un proceso secuencial, caracterizado por la incorporación monomérica y sucesiva de desoxirribonucleótidos siguiendo el principio de complementariedad de bases (Figura 3.2).

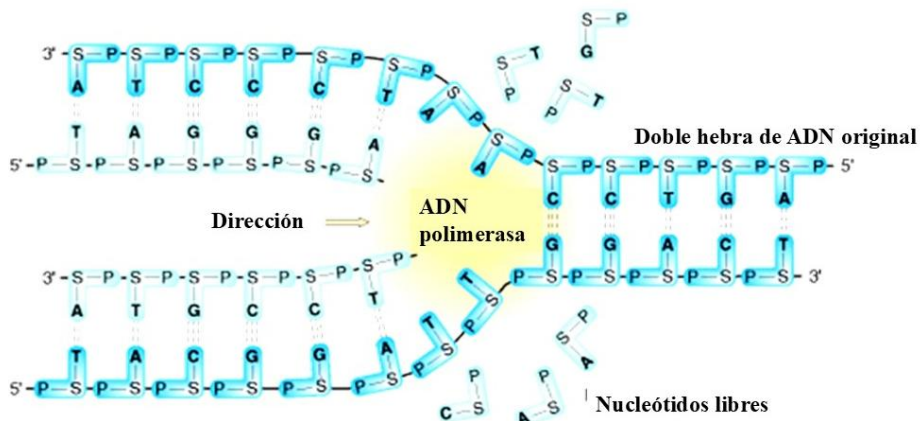


Figura 3.2. Replicación simultánea y secuencial. Tomado de Griffiths *et al.* (2000), con modificaciones.

- Carácter bidireccional: tras el reconocimiento de las secuencias de origen por proteínas iniciadoras, enzimas especializadas (helicatas) rompen los puentes de hidrógeno entre las bases nitrogenadas, provocando el desenrollamiento de la doble hélice y la formación de una burbuja de replicación. Cada burbuja está flanqueada por dos horquillas de replicación que se desplazan en direcciones opuestas. Por lo tanto, la polimerización progresa bidireccionalmente desde el punto de origen hacia ambos extremos de la burbuja (Figura 3.3).

- Replicación semidiscontinua: esta propiedad deriva de la especificidad enzimática de la ADN polimerasa, la cual solo puede sintetizar en dirección 5' → 3', leyendo la hebra molde en dirección 3' → 5'. Debido a la naturaleza antiparalela del ADN, se generan dos tipos de síntesis,

hebra líder y hebra rezagada (**Figura 3.3**). La síntesis de la hebra líder o continua progresa de forma ininterrumpida en el mismo sentido que el avance de la horquilla. La síntesis de la hebra rezagada o discontinua se logra mediante la producción de segmentos cortos de ADN denominados fragmentos de Okazaki, los cuales son posteriormente unidos. En este caso, la polimerasa debe sintetizar en dirección opuesta al avance de la horquilla. Debido a la coexistencia de una síntesis continua y una fragmentada, el proceso se define globalmente como semidiscontinuo.

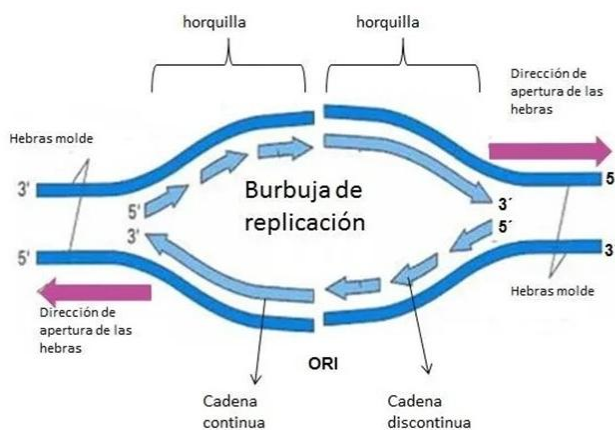


Figura 3.3. Replicación bidireccional y semidiscontinua. Tomado de tuguidadeaprendizaje ([burbuja-de-replicacion-del-ADN.webp \(617×403\)](#))

ENZIMOLOGÍA

Polimerasas

Las polimerasas representan una familia de enzimas fundamentales en el metabolismo de los ácidos nucleicos. Su función principal es la síntesis de nuevas cadenas de ADN o ARN mediante la polimerización de nucleótidos, siguiendo siempre una dirección de síntesis de 5' → 3'. Estas enzimas requieren una cadena molde para dirigir la secuencia de la nueva hebra, pudiendo clasificarse según el sustrato que utilizan y el producto que generan:

- La ADN polimerasa dependiente de ADN cataliza la replicación del genoma.
- La ADN polimerasa dependiente de ARN es conocida también como transcriptasa inversa, sintetiza ADN a partir de un molde de ARN.
- La ARN polimerasa dependiente de ADN es responsable del proceso de transcripción (síntesis de ARN).
- La ARN polimerasa dependiente de ARN es la enzima implicada en la replicación de ciertos genomas virales.

Requisitos para la replicación por la ADN polimerasa dirigida por ADN

Para que la polimerización se lleve a cabo de manera efectiva, el complejo enzimático requiere de los siguientes componentes:

- Cadena molde o *template*: es la hebra de ADN parental que dicta la secuencia de bases complementarias.
- Sustratos: son los desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTP), los cuales proporcionan tanto las unidades estructurales como la energía necesaria para la formación del enlace fosfodiéster.
- Cofactores: iones metálicos bivalentes, fundamentalmente magnesio (Mg^{2+}) o manganeso (Mn^{2+}), necesarios para la actividad catalítica.
- Cebador o *primer*: la replicación no es un proceso autoiniciador; las ADN polimerasas requieren un extremo 3'-OH libre preexistente para añadir el primer dNTP. En células eucariotas, este cebador consiste en un fragmento corto de ARN sintetizado por una primasa.

Clasificación y funciones de las ADN polimerasas

La actividad catalítica se describió inicialmente en organismos procariontes como *E. coli*, identificándose tres tipos principales (I, II y III). La Pol I destaca por su capacidad de síntesis $5' \rightarrow 3'$ y su actividad exonucleasa $5' \rightarrow 3'$, que le permite eliminar los cebadores de ARN y reemplazarlos por ADN, además de poseer actividad exonucleasa $3' \rightarrow 5'$ para la corrección de errores.

En el sistema eucariota, las polimerasas se designan con letras griegas y presentan funciones altamente especializadas:

- α (alfa): posee actividad primasa; inicia la síntesis del cebador de ARN y los primeros nucleótidos de ADN.
- β (beta): implicada primordialmente en los mecanismos de reparación del ADN y corrección de errores.
- δ (delta) y ϵ (épsilon): son las principales enzimas responsables de la elongación de las hebras líder y rezagada, respectivamente.
- γ (gamma): es la encargada exclusivamente de la replicación del ADN mitocondrial.

Procesividad de las polimerasas y el rol del PCNA

La procesividad se define como la capacidad de una polimerasa para catalizar la incorporación consecutiva de múltiples nucleótidos sin desprenderse de la cadena molde. Las polimerasas δ y ϵ presentan los índices más altos de procesividad en la célula.

Este fenómeno es posible gracias a la interacción con el Antígeno Nuclear de Células en Proliferación (PCNA). El PCNA es un complejo trimérico que forma una estructura anular o "abrazadera deslizante" que circunda el ADN. Al anclar la polimerasa al molde, el PCNA evita su disociación prematura, permitiendo la síntesis de fragmentos extensos de ADN de manera eficiente y acelerada (**Figura 3.4**).

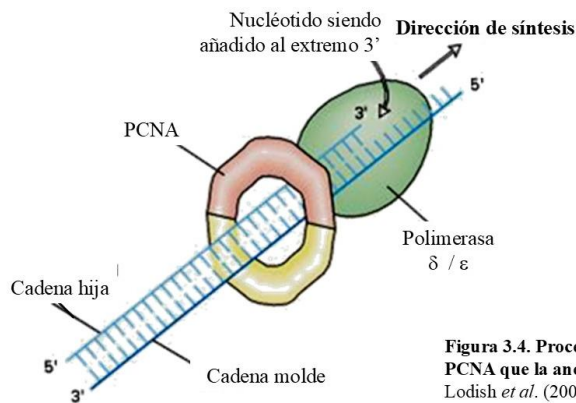


Figura 3.4. Procesividad de la polimerasa gracias al PCNA que la ancla al ADN (en eucariotas). Tomado de Lodish *et al.* (2000).

Otras proteínas

Además del complejo de polimerasas, la replicación del ADN requiere la participación coordinada de un conjunto de proteínas y enzimas especializadas que aseguran la apertura, estabilidad y topología adecuada de la doble hélice.

El proceso se inicia con el reconocimiento de secuencias específicas mediante las proteínas de reconocimiento de orígenes (ORC), las cuales facilitan el reclutamiento de los demás componentes del replisoma (**Figura 3.5**). Las helicasas son enzimas que catalizan la ruptura de los puentes de hidrógeno entre las bases nitrogenadas, permitiendo la separación de las hebras parentales. Debido a la naturaleza bidireccional del proceso, las helicasas actúan simultáneamente hacia ambos extremos, expandiendo la burbuja de replicación. Las proteínas de unión a hebra sencilla (SSB/RPA) se asocian a las cadenas de ADN monocatenario para estabilizarlas y evitar que se reasocien o formen estructuras secundarias mientras actúan como molde. Las topoisomerasas alivian la tensión torsional y el superenrollamiento generado por el avance de la horquilla de replicación, realizando cortes transitorios en el esqueleto de azúcar-

fosfato. Las nucleasas FEN1 y RNasa H1 son responsables de la degradación y eliminación de los cebadores de ARN una vez que han cumplido su función iniciadora.

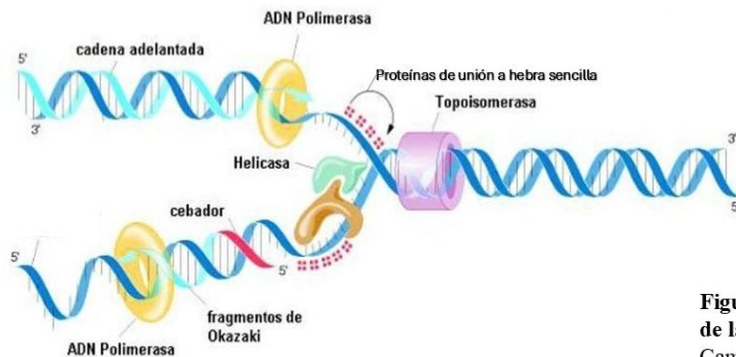


Figura 3.5. Replicosoma: proteínas y enzimas de la horquilla de replicación. Adaptado de Campbell *et al.* (2014).

Dinámica de la horquilla de replicación

La iniciación formal de la síntesis es mediada por la polimerasa α o primasa, la cual cataliza la formación de un cebador de ARN. Este fragmento proporciona el extremo 3'-OH libre necesario para la incorporación del primer dNTP. Posteriormente, ocurre el intercambio de polimerasa (*polymerase switching*), donde las polimerasas δ o ϵ asumen la elongación debido a su elevada procesividad.

En la síntesis de la hebra continua, la polimerasa progresa de manera ininterrumpida siguiendo la apertura de la horquilla. Por el contrario, durante la síntesis de la hebra rezagada, surge una asimetría funcional en la horquilla debido a la especificidad de las polimerasas para leer en dirección $3' \rightarrow 5'$ y sintetizar en $5' \rightarrow 3'$. Debido a que la síntesis de ADN solo puede progresar en dirección $5' \rightarrow 3'$, esta hebra molde con orientación $5' \rightarrow 3'$ requiere un mecanismo de síntesis discontinua. En este proceso, la primasa sintetiza múltiples cebadores de ARN a intervalos regulares. La ADN polimerasa δ o ϵ extiende estos cebadores mediante la incorporación de aproximadamente 200 desoxirribonucleótidos, conformando los denominados fragmentos de Okazaki. Para permitir este avance, la hebra molde se pliega en un bucle funcional, exponiendo segmentos sucesivos para la polimerización (**Figura 3.6**).

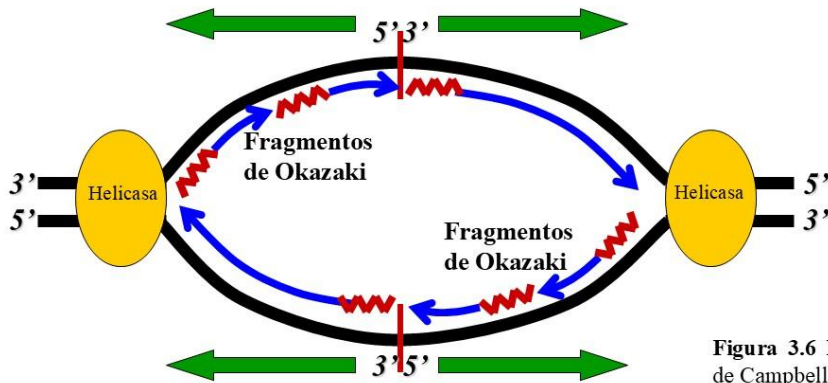


Figura 3.6 Fragmentos de Okazaki. Adaptado de Campbell *et al.* (2014).

Topoisomerasas

El desenrollamiento de la doble hélice por la helicasa genera una tensión mecánica y un superenrollamiento positivo por delante de la horquilla de replicación. Este fenómeno es mitigado por las topoisomerasas. Las topoisomerasas tipo I catalizan la rotura transitoria de un solo enlace fosfodiéster en una de las hebras. Esto permite que la hebra intacta pase a través de la brecha, reduciendo el grado de torsión en una unidad antes de que la enzima vuelva a ligar los extremos. La reacción involucra un residuo de tirosina en el sitio activo de la enzima, que se une covalentemente al ADN para mantener el control de la tensión liberada durante la catálisis.

Terminación y procesamiento de fragmentos

La fase de terminación ocurre cuando las múltiples burbujas de replicación convergen (se encuentran) a lo largo de la molécula lineal de ADN. Para consolidar la integridad de la nueva hebra, se lleva a cabo una serie de pasos. En primer lugar, se eliminan los cebadores, las nucleasas FEN1 y RNasa H1 degradan los cebadores de ARN. Luego, la ADN polimerasa cataliza la inserción de desoxirribonucleótidos en los espacios resultantes (brechas), utilizando el extremo 3' del fragmento adyacente como iniciador. Finalmente, la ADN ligasa I sella las muescas (*nicks*) restantes en el esqueleto de azúcar-fosfato, uniendo covalentemente los fragmentos de Okazaki para formar una cadena continua (**Figura 3.7**).

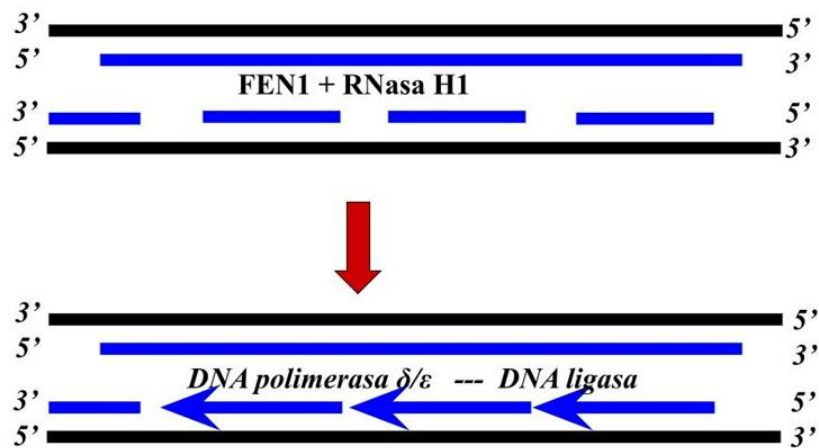


Figura 3.7. Terminación y procesamiento de fragmentos.

La maquinaria de replicación enfrenta una limitación intrínseca, la ADN polimerasa no puede completar el extremo de la hebra hija una vez que el último cebador de ARN es removido, ya que no dispone de un extremo previo para iniciar la síntesis. Estas regiones terminales están compuestas por ADN no codificante altamente repetitivo que actúa como una zona de sacrificio. Con cada ciclo de división, los telómeros experimentan un acortamiento progresivo. Cuando este desgaste alcanza secuencias codificantes críticas, la célula pierde su funcionalidad, proceso que constituye la base fisiológica del envejecimiento biológico y la senescencia celular.

Telomerasas

El mantenimiento de la integridad genómica en los extremos cromosómicos es un proceso biológico crítico, restringido a linajes celulares específicos con alta capacidad de proliferación. En este contexto, resulta clave la acción de la enzima telomerasa. A diferencia de las células somáticas maduras, donde la ausencia de telomerasa conduce al acortamiento progresivo del ADN, ciertos grupos celulares preservan su función gracias a la expresión de esta enzima. Esto ocurre en las células germinales donde se asegura la transmisión de cromosomas íntegros a la descendencia; tejidos fetales, que permiten el rápido desarrollo y expansión celular durante la embriogénesis; en células madre (*stem cells*) caracterizadas por su estado indiferenciado y su capacidad de autorrenovación continua.

La telomerasa es una ribonucleoproteína que funciona como una transcriptasa inversa especializada (TERT), capaz de sintetizar ADN utilizando como molde una secuencia de ARN propia integrada en su estructura. El mecanismo de acción de la telomerasa se observa en la **Figura 3.8:**

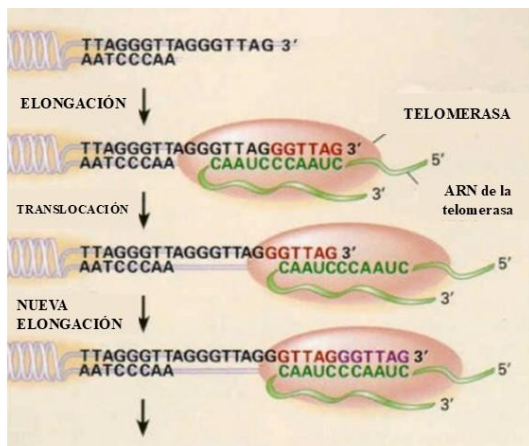


Figura 3.8. Mecanismo de acción de la telomerasa.

Tomado de

https://www.medwave.cl/medios/cursos/Oncologia/oncologia_basica/Image2-telomerasa.jpg

- Reconocimiento y elongación: la enzima posee un fragmento de ARN complementario a las repeticiones teloméricas de los eucariotas. Se sitúa en el extremo 3' sobresaliente de la hebra parental y, utilizando su propio ARN como plantilla, cataliza la inserción de desoxirribonucleótidos para elongar dicha cadena.
- Translocación: tras sintetizar una unidad repetitiva (generalmente de seis nucleótidos), la telomerasa se transloca hacia el nuevo extremo 3', repitiendo el proceso de polimerización múltiples veces para extender significativamente el telómero.

Una vez que la telomerasa ha extendido suficientemente la hebra molde (extremo 3'), la maquinaria de replicación convencional interviene para completar la hebra complementaria mediante dos procesos:

- Primación y elongación: La ADN polimerasa α o primasa sintetiza un nuevo cebador de ARN en el extremo extendido. Posteriormente, las polimerasas δ y ϵ llevan a cabo la elongación de la hebra hija.
- Maduración: finalmente, las nucleasas eliminan el cebador de ARN y una ADN ligasa sella las muescas residuales, estabilizando la estructura terminal del cromosoma.

Este mecanismo previene la pérdida de información en regiones codificantes, retrasando el proceso de senescencia en estas poblaciones celulares críticas como células germinales, células de tejidos fetales y células madre.

BASES MOLECULARES DE LA MUTACIÓN Y LA REPARACIÓN DEL ADN

Concepto de mutación

El concepto de mutación se define como cualquier alteración permanente en la secuencia de nucleótidos del ADN. Estas modificaciones pueden ser hereditarias o no, dependiendo

exclusivamente del linaje celular en el que se originen: si afectan a las células germinales y participan en la fecundación, se transmitirán a la descendencia; por el contrario, si ocurren en células somáticas, la alteración persistirá solo en el linaje celular derivado de la célula mutada, sin trascender a la progenie.

Las mutaciones son ubicuas y pueden localizarse en cualquier región del genoma (codificante o no codificante, nuclear o mitocondrial). Es fundamental desmitificar la connotación negativa del término: aunque muchas son perjudiciales, otras son neutras o incluso beneficiosas, constituyendo el motor primigenio de la evolución biológica.

Las variaciones en la secuencia de nucleótidos del ADN se categorizan según su prevalencia poblacional y su impacto funcional. Existe una distinción entre mutación y polimorfismo. Desde una perspectiva poblacional, la diferencia radica en la frecuencia de aparición. La mutación es el cambio en la secuencia que se presenta en menos del 1 % de la población. En el polimorfismo, la variante genética se encuentra en una frecuencia superior al 1 %, lo que sugiere una estabilidad relativa en el acervo genético poblacional como los polimorfismos de nucleótido simple (SNPs) que superan dicho umbral.

Tipos y taxonomía de las mutaciones

Las mutaciones se clasifican según diversos criterios institucionales:

- Por el tipo de célula: germinales (1) o somáticas (2).
- Por su magnitud molecular, es decir, extensión del material genético comprometido: cromosómicas (3), de mediana escala (4) y puntuales (5).
- Por su efecto fenotípico: neutras o silenciosas o sinónimas (6) y no silenciosas, dentro de las cuales se encuentran las mutaciones deletéreas o perjudiciales (7) y las mutaciones beneficiosas (8).
- Por su expresión alélica: dominantes (9) o recesivas (10).
- Por su origen: espontáneas por errores endógenos (11) o inducidas por agentes mutágenos (12). Esta clasificación está ligada a la etiología de las mutaciones.

1. Mutaciones en la línea germinal

Se originan durante las divisiones celulares de la gametogénesis. Se estima una tasa de 10^{-6} mutaciones por locus por división. En la espermatogénesis humana, pueden surgir cerca de 100 mutaciones por errores de replicación (aproximadamente una por cada 33 Mb). No obstante, su impacto patológico es bajo, ya que muchas son recesivas o resultan letales *in utero*, impidiendo el nacimiento.

2. Mutaciones somáticas y mosaicismo

Estas mutaciones se transmiten únicamente por mitosis a las células hijas dentro del organismo. Su tasa de incidencia es de 10^{-10} por par de bases y división. Si la mutación ocurre tras la formación del cigoto, pero antes del desarrollo completo, el individuo se convierte en un mosaico genético. La proporción de células afectadas depende del momento ontogénico (**Figura 3.9**):

- Temprana: Una gran parte del organismo portará la mutación.
- Tardía: El cambio quedará restringido a un sector o tejido específico.

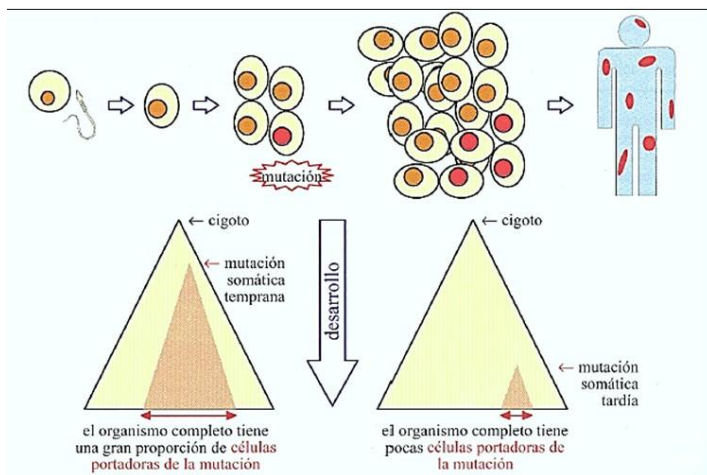


Figura 3.9. Mosaicismo por mutación somática temprana. Si la mutación ocurre en las primeras divisiones después del cigoto (**izquierda**), una gran proporción de las células del cuerpo heredarán esa mutación (representada por el triángulo grande naranja). Mutación somática tardía (**derecha**): Si la mutación ocurre más tarde en el desarrollo, solo un pequeño linaje de células se verá afectado, resultando en un mosaicismo mucho más localizado. Tomado de Nussbaum *et al.* (2016).

Ejemplo de caso clínico: se han documentado casos donde pruebas de maternidad mediante mucosa yugal resultan negativas, mientras que pruebas sanguíneas confirman el parentesco, revelando que la madre es un mosaico con una mutación específica en los marcadores moleculares de un tejido, pero no en otro.

3. Cromosómicas

Son mutaciones cromosómicas aquellas de gran escala que afectan regiones de millones de pares de bases mediante duplicaciones, deleciones o reordenamientos estructurales visibles al microscopio.

4. Mediana escala

Comprometen varios pares de bases.

5. Puntuales

Son mutaciones puntuales que implican normalmente un solo nucleótido. Dentro de este tipo de mutaciones, se distinguen tres mecanismos principales a nivel molecular (**Figura 3.10**):

- Mecanismo de sustitución: cambia un nucleótido por otro sin alterar la longitud de la molécula. Dentro de este tipo de mutaciones, existen a su vez, dos subtipos críticos, de

transición y de transversión. Se llama mutación de sustitución por transición cuando el cambio ocurre de una purina por otra ($A \leftrightarrow G$) o de una pirimidina por otra ($T \leftrightarrow C$). Aunque estadísticamente menos probables, son más frecuentes en el genoma que las transversiones. En las mutuales puntuales de sustitución por transversión cambio una purina por una pirimidina o viceversa ($A \leftrightarrow C$).

- Mecanismo de deleción: ocurre una pérdida de un nucleótido, resultando en una molécula más corta.
- Inserción: existe una adición de un nucleótido, resultando en una molécula más larga.

Ejemplo de caso clínico: ocurre con una mutación puntual por transición de G por A en la región reguladora (promotor) del gen del factor IX de coagulación; esto puede impedir la unión de factores de transcripción. Esta alteración en la regulación génica disminuye la actividad coagulante significativamente, resultando en la hemofilia tipo B.

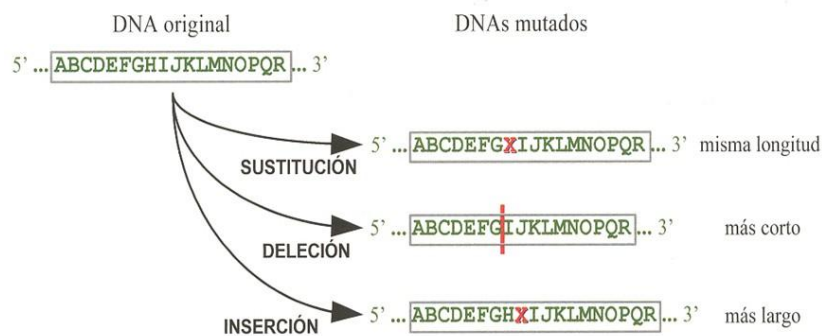


Figura 3.10. Mecanismos de mutación a nivel molecular (mutaciones puntuales).

6. Mutaciones neutras, silenciosas o sinónimas

Las alteraciones genéticas no se manifiestan en la estructura proteica. Debido a que el código genético es degenerado (múltiples tripletes codifican para un mismo aminoácido), una sustitución de bases puede no alterar la secuencia polipeptídica (**Figura 3.11**). Este tipo de cambio se conoce como cambio de sentido (*missense*) y cuando este es conservador, es decir, que el nuevo aminoácido posee propiedades fisicoquímicas similares al aminoácido original, no hay un efecto fenotípico. Por ejemplo, en el gen de la β -globina, una transición de “T” por “G” ($ACT \rightarrow ACG$) mantiene la incorporación de treonina, resultando en una proteína funcionalmente normal.

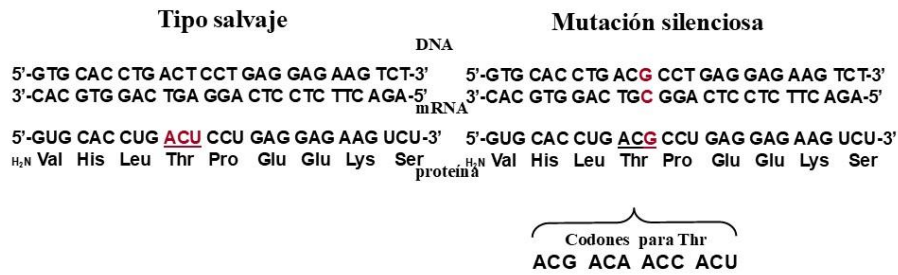


Figura 3.11. Ejemplo de mutación silenciosa de la β-globina por la cual no se produce un efecto fenotípico. Cambia la secuencia nucleotídica, pero no se traduce en un cambio de aminoácido, por lo que la proteína sintetizada es normal.

7. Mutaciones no silenciosas deletéreas o perjudiciales

A diferencia de las mutaciones silenciosas, existe un cambio en la estructura proteica. Dependiendo del cambio producido, este tipo de mutaciones se subdividen en distintos tipos:

- Cambio de sentido (*missense*): este tipo de cambio resulta en la incorporación de un aminoácido distinto y es de tipo no conservador, es decir, que existen diferencias en carga o polaridad entre ambos aminoácidos (el nuevo y el original), lo que puede causar patologías. Un ejemplo es el de la anemia falciforme (ocurre una sustitución de ácido glutámico por valina) (**Figura 3.12**).

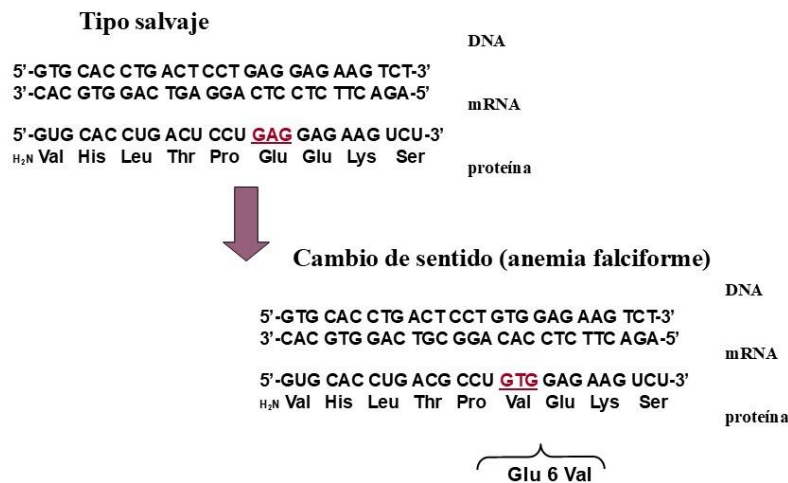


Figura 3.12. Ejemplo de mutación no silenciosa deletérea, con cambio de sentido. El cambio en la secuencia nucleotídica se traduce en un cambio de aminoácido (ácido glutámico → valina), lo que provoca la anemia falciforme.

- Cambio del marco de lectura (*frameshift*): ocurren inserciones o deleciones de nucleótidos en cantidades no múltiplos de tres que alteran toda la lectura posterior del mensaje. Un ejemplo crítico es la enfermedad de Tay-Sachs, trastorno autosómico recesivo que provoca una acumulación letal de gangliósidos (**Figura 3.13**).

Tipo salvaje

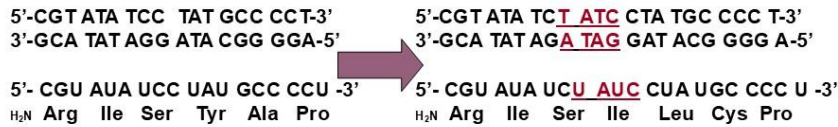


Figura 3.13. Ejemplo de mutación no silenciosa deletérea, con cambio del marco de lectura. Cambia la secuencia nucleotídica y ocurre un cambio del marco de lectura. Este es el cambio de lectura que ocurre en la enfermedad de Tay-Sachs.

- Supresión de aminoácidos: ocurre cuando la delección de un triplete completo elimina un residuo sin alterar el marco de lectura (**Figura 3.14**). La mutación $\Delta F508$ en la fibrosis quística ocasiona la pérdida de fenilalanina, lo que impide el plegamiento correcto de la proteína de transporte de cloro.

Tipo salvaje



Figura 3.14. Ejemplo de mutación no silenciosa deletérea, delección de un aminoácido, sin cambio del marco de lectura. Cambia la secuencia nucleotídica y se produce una delección de un aminoácido en la proteína producida. Este es el ejemplo de la fibrosis quística, en la que la mutación $\Delta F508$ provoca la delección de la fenilalanina en la posición 508 de la proteína, lo que causa dicha enfermedad.

- Terminación prematura (*nonsense*): la generación de un codón de parada (*stop*) genera una proteína truncada e inactiva (**Figura 3.15**). Esto ocurre con la neurofibromina en la neurofibromatosis tipo 1, donde la pérdida de inhibición sobre la proteína *p21ras* deriva en proliferación celular descontrolada.

Tipo salvaje

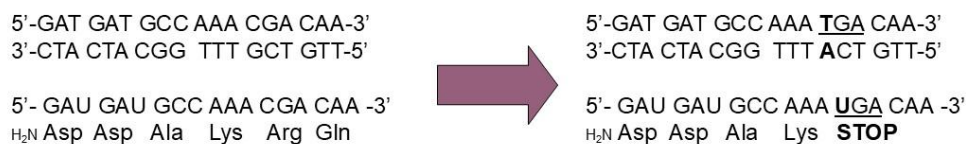


Figura 3.15. Ejemplo de mutación no silenciosa deletérea que causa terminación prematura. Cambia la secuencia nucleotídica y se produce un codón de paro o *stop*. Este es el ejemplo de la neurofibromatosis tipo 1.

8. Mutaciones beneficiosas

Aunque solemos asociar la palabra "mutación" con enfermedades, desde el punto de vista evolutivo, las mutaciones beneficiosas son el motor que permite a las especies adaptarse y

sobrevivir. Una mutación es beneficiosa cuando aumenta la aptitud biológica (*fitness*) del individuo, mejorando su capacidad de sobrevivir o reproducirse en un entorno específico. A continuación, se citan los ejemplos más representativos en humanos y otros organismos:

- Resistencia a enfermedades infecciosas: es el ejemplo más claro de selección natural reciente en humanos.
- Resistencia al VIH (por la mutación CCR5-Δ32): algunas personas poseen una delección de 32 pares de bases en el gen CCR5. Esto impide que el virus del VIH entre en las células T, otorgando una inmunidad casi total a quienes heredan dos copias de esta mutación.
- Resistencia a la malaria (por anemia falciforme): ser portador de una sola copia del gen de la anemia falciforme (estado heterocigoto) deforma ligeramente los glóbulos rojos, lo que impide que el parásito de la malaria se reproduzca eficientemente, protegiendo al individuo en zonas endémicas.
- Persistencia de la lactasa: originalmente, los humanos perdían la capacidad de digerir leche tras el destete. Una mutación en el gen *LCT* permitió a los adultos seguir produciendo lactasa. Esto fue una ventaja enorme para las poblaciones ganaderas de Europa y África, permitiéndoles acceder a una fuente de nutrición constante.
- Aumento de copias de amilasa (*AMY1*): las poblaciones con dietas ricas en almidón presentan más copias de este gen, lo que les permite digerir carbohidratos complejos de manera mucho más eficiente que los cazadores-recolectores.
- Mutación *EPAS1* (supervivencia en las alturas): los tibetanos poseen una variante del gen *EPAS1* (heredada de los denisovanos) que les permite vivir a más de 4.000 metros de altura sin que su sangre se espese peligrosamente por el exceso de glóbulos rojos, evitando infartos o edemas.
- Densidad ósea elevada (*LRP5*): una mutación en el gen *LRP5* provoca huesos extremadamente densos que son prácticamente imposibles de romper, lo cual es una ventaja física evidente contra traumatismos.

Es fundamental entender que una mutación no es "buena" por sí misma, sino que depende del entorno. Por ejemplo, la resistencia a la malaria es beneficiosa en África central, pero en un lugar sin malaria, tener esa mutación puede causar anemia. Otro ejemplo es el caso de las bacterias que presentan mutaciones que les dan resistencia a antibióticos. Esto tiene una ventaja

en un hospital, pero fuera de él, esa mutación suele hacerlas crecer más lento que las bacterias normales.

9. Mutaciones dominantes

Desde una perspectiva genética y clínica, las mutaciones pueden categorizarse según su expresión alélica y el modo en que alteran el fenotipo en relación con el alelo silvestre (*wild-type*). Esta clasificación es fundamental para comprender los patrones de herencia mendeliana y la manifestación de enfermedades genéticas.

Una mutación se define como dominante cuando la presencia de un solo alelo mutado en el genotipo (estado heterocigoto) es suficiente para que el rasgo o la patología se manifieste fenotípicamente. Generalmente, estas mutaciones implican una ganancia de función (*gain-of-function*), donde el producto génico adquiere una actividad biológica nueva o aumentada, o bien un efecto dominante negativo, donde la proteína mutante interfiere activamente con la función de la proteína normal producida por el alelo sano. Un ejemplo clínico es la acondroplasia, una condición de herencia autosómica dominante causada por una mutación en el gen *FGFR3*. Un individuo con un solo alelo mutado presentará el fenotipo característico.

10. Mutaciones recesivas

Una mutación es recesiva cuando su efecto fenotípico solo se manifiesta si ambos alelos del locus están mutados (estado homocigoto o heterocigoto compuesto). En los individuos heterocigotos, el alelo normal suele ser capaz de producir suficiente proteína funcional para mantener la homeostasis, por lo que el individuo se denomina portador sano. Comúnmente se asocian a una pérdida de función (*loss-of-function*). La patología surge únicamente cuando la actividad enzimática o proteica cae por debajo de un umbral crítico debido a la ausencia de un alelo funcional. Ejemplos clínicos causados por este tipo de mutación son la fibrosis quística, la anemia falciforme y la enfermedad de Tay-Sachs. Para que un descendiente manifieste la enfermedad, ambos progenitores deben transmitir un alelo mutado. En la **Figura 3.16** se observa el ejemplo de este tipo de mutaciones donde un padre y una madre son portadores; es decir, uno de sus alelos es normal y el otro es el mutado. La proporción de tener hijos con la enfermedad es de 3 a 1 y dos de estos van a ser portadores.

En la **Tabla 3.1** se resumen las diferencias entre las mutaciones dominantes y recesivas.

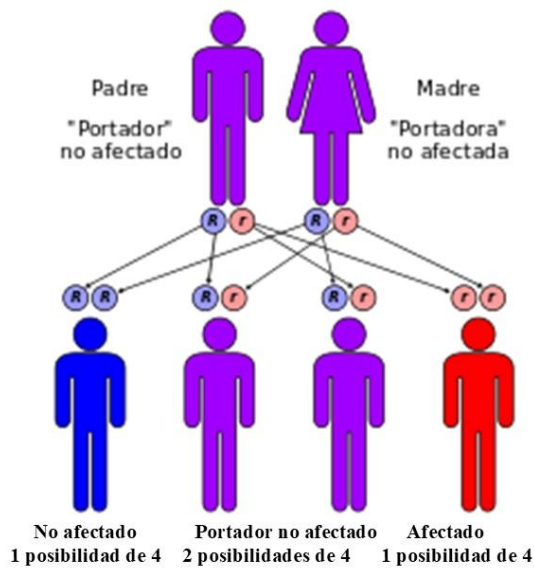


Figura 3.16. Ejemplo de la herencia de mutaciones autosómicas recesivas. Un ejemplo es la enfermedad de Tay-Sachs.

Tabla 3.1. Diferencias entre mutaciones dominantes y recesivas.

| Característica | Mutación dominante | Mutación recesiva |
|--------------------------------|---|---|
| Genotipo para expresión | Heterocigota (Aa) o homocigota (AA) | Solo homocigota (aa) |
| Mecanismo típico | Ganancia de función/dominante negativo | Pérdida de función |
| Estado de portador | No existe. El individuo siempre es afectado | Existe. Heterocigota clínicamente normal |
| Transmisión vertical | Común, se observa en todas las generaciones | Poco frecuente, puede saltar generaciones |

Causas y mecanismos de mutaciones

Las enfermedades pueden originarse a partir de una etiología multicausal, donde convergen factores endógenos, tales como la predisposición genética y los errores metabólicos intrínsecos, con agentes exógenos, que incluyen factores ambientales, químicos y biológicos externos que comprometen la homeostasis del organismo. Según su etiología, se distinguen las mutaciones endógenas y exógenas.

11. Mutaciones endógenas

Surgen por procesos intrínsecos de la célula:

- Desaminación oxidativa: hay una pérdida de grupos amino que transforma la citosina en uracilo o la 5-metilcitosina en timina.

- Inestabilidad química: existe una ruptura del enlace N-glicosídico que genera sitiosapurínicos o apirimidínicos (sitios AP).
- Especies Reactivas del Oxígeno (ROS): los radicales libres como el superóxido que pueden fragmentar la estructura del ADN.

12. Mutaciones exógenas

Son mutaciones provocadas por agentes fisicoquímicos externos, químicos y físicos. Entre los agentes químicos, se encuentran las sustancias como el bromuro de etidio (intercalante) o el benzopireno del tabaco. Como agentes físicos se encuentran la radiación UV, la cual induce la formación de dímeros de timina; radiaciones ionizantes como los rayos X y γ , los cuales poseen mayor penetración y pueden causar rupturas de doble hebra.

Mecanismo de reparación

Además de los mecanismos de reparación propiamente dichos, existen los mecanismos preventivos y los modos de acción directos para revertir la lesión. La célula dispone de mecanismos preventivos que eliminan a los agentes mutágenos antes de que causen daño en el ADN. Por ejemplo: la superóxido dismutasa elimina las especies reactivas del oxígeno, el peróxido generado en este proceso es eliminado por la enzima catalasa.

Como sistema preventivo de reversión directa de la lesión, se citan a continuación algunos ejemplos. La enzima fotoliasa rompe los enlaces de los fotodímeros que se forman debido a la exposición a los rayos UV y restablece las timinas adyacentes de manera convencional como se encuentran en el ADN. Esta enzima se encuentra en insectos y hongos. Otro tipo de reversión directa de la lesión es proteína enzima alquiltransferasa, la cual elimina el grupo alquilo de las bases alquiladas y ese grupo alquilo pasa a formar parte de la proteína. Este tipo de proteínas no son enzimas porque no cumplen con la premisa de no alterar su estructura en el proceso. Las alquiltransferasas se inactivan cuando captan el grupo alquilo, por lo tanto, este sistema se satura. Si tenemos muchos cambios de este tipo y las células no llegan a sintetizar la cantidad suficiente de estas proteínas.

Entre los mecanismos de reparación posdaño, encontramos los siguientes:

- Lectura de prueba (*proofreading*): actividad 3' \rightarrow 5' exonucleasa de la ADN polimerasa que corrige errores durante la síntesis.
- Sistema Mut HLS: reparación posreplicativa que identifica la hebra hija (no metilada) para corregir apareamientos incorrectos. Es un sistema de reparación que ocurre posreplicación. Después de que ocurre la replicación, es decir, que verifica que no haya

cambios en el ADN. En la **Figura 3.17** se observa este mecanismo de acción. En este ejemplo, ocurrió un cambio en la hebra que recién se sintetizó de una T por una G (el cambio está representado por un triángulo). Luego de la replicación, la hebra molde está metilada y la recién sintetizada, no. De esta manera, la célula reconoce cuál es la hebra nueva, lo que le permite reconocer cuál es el nucleótido original y cuál el alterado. El cambio ocurrido en el ADN es reconocido por la proteína MutS, la proteína MutH reconoce cuál es la hebra metilada y la MutL quita ese fragmento de ADN. Luego, la ADN polimerasa completa el hueco y la ligasa sella el enlace fosfodiéster con gasto energético. Después, la enzima Dam metilasa metila la hebra nueva.

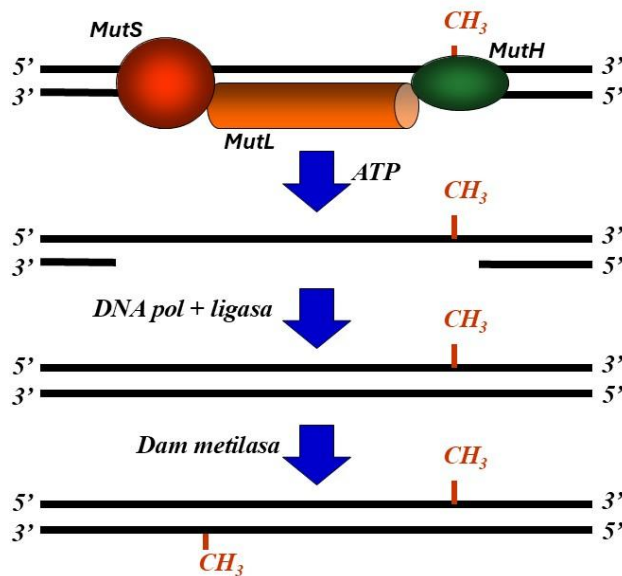


Figura 3.17. Mecanismo de reparación de daño de ADN, sistema Mut HLS.

- Reparación por Escisión de Nucleótidos (NER): elimina lesiones voluminosas (como dímeros de timina o daños por tabaco) mediante escinucleasas y helicasas. En la **Figura 3.18** se representa una de las hebras del ADN. Este tipo de mutaciones genera una distorsión voluminosa del ADN, la cual es reconocida por un complejo multienzimático. El cambio voluminoso está representado por una estrella. La escinucleasa rompe el enlace fosfodiéster en una de las hebras, corriente arriba y corriente abajo de donde está el cambio. Luego, helicasa elimina esos nucleótidos y una polimerasa a partir del 3'-OH polimeriza copiando la hebra complementaria. Finalmente, la ligasa sella esta mella, con gasto energético. En los organismos procariontas, este sistema se llama uvr. En eucariotas, hay numerosas proteínas involucradas constituyendo un complejo multienzimático.

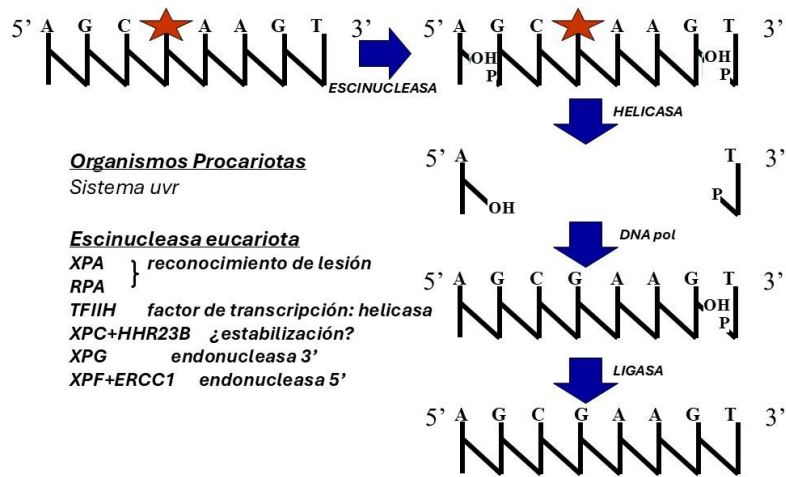


Figura 3.18. Mecanismo de reparación de daño de ADN, sistema de reparación por escisión de nucleótidos (NER).

- Reparación por escisión de bases (BER): este sistema actúa cuando hay cambio en una base. En la **Figura 3.19** se representa sólo una de las hebras del ADN. Una N-glicosilasa rompe el enlace glicosídico, se libera la base y se genera un sitio básico, que es reconocido por una endonucleasa AP (de apurínico o apirimidínico). Esta rompe el enlace fosfodiéster 5' del sitio básico. Luego, pueden ocurrir dos cosas. Una ADN polimerasa β (con actividad desoxirribo-fosfodiesterasa y actúa en la reparación del ADN) quite ese nucleótido abásico y coloque el nucleótido que falta. Luego, la ligasa sella la mella. O también puede ocurrir que, una ADN polimerasa δ polimerice una hebra que luego será cortada por una endonucleasa y finalmente, una ligasa sella la mella y se forma el enlace fosfodiéster.

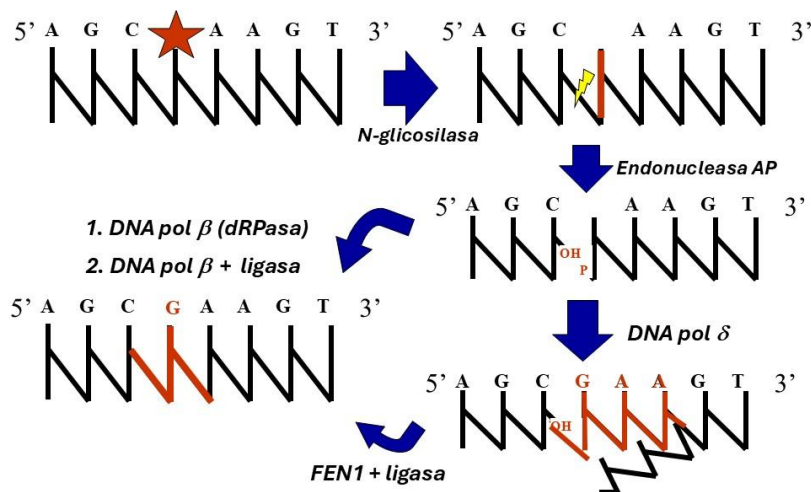


Figura 3.19. Mecanismo de reparación de daño de ADN, sistema de reparación por escisión de base (BER).

- **Recombinación no homóloga:** es un mecanismo de reparación de roturas de doble cadena del ADN en el cual los extremos del ADN se vuelven a unir sin necesidad de una homología extensa entre las secuencias (**Figura 3.20**). En algunos casos, las proteínas implicadas pueden utilizar pequeñas regiones de microhomología para alinear los extremos antes de su unión. Durante este proceso, las hebras pueden sufrir cortes o pérdidas de nucleótidos, por lo que este sistema es considerado propenso a errores. No obstante, permite restaurar la continuidad del cromosoma cuando se producen roturas del ADN.

- **Recombinación homóloga:** es un mecanismo de reparación más preciso que utiliza una molécula de ADN homóloga como molde para corregir la lesión. Generalmente se emplea la cromátida hermana o el cromosoma homólogo, lo que permite restaurar la secuencia original del ADN. Por ejemplo, si la lesión ocurre en un cromosoma, la información presente en el cromosoma homólogo puede utilizarse como guía para reparar el daño.

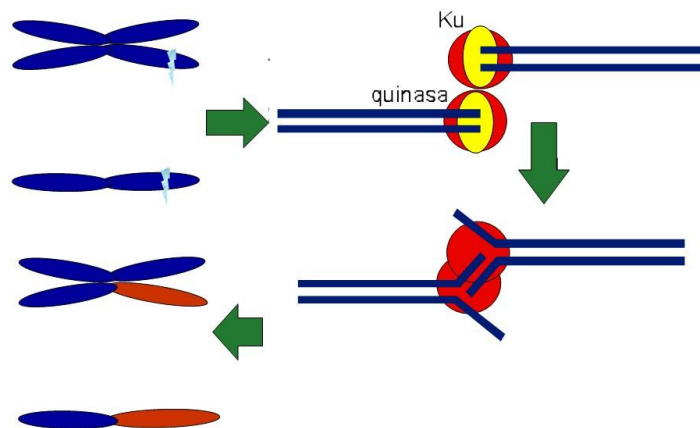


Figura 3.20. Mecanismo de reparación de daño de ADN, sistema de reparación por recombinación no homóloga.

Transferencia e hibridación de ácidos nucleicos: desnaturalización y renaturalización del ADN

La estabilidad de la doble hélice de ADN está determinada por las interacciones de apilamiento de bases y, fundamentalmente, por los puentes de hidrógeno entre cadenas complementarias. Al someter la molécula a un incremento de energía térmica, se produce la desnaturalización o "fusión" del ADN, rompiendo dichas interacciones y resultando en la formación de hebras monocatenarias. Este proceso se cuantifica mediante la temperatura de *melting* (T_m), definida como el valor térmico en el cual el 50 % del ADN se encuentra en estado

de cadena sencilla y el 50 % permanece como doble hélice (**Figura 3.21**). La T_m es una propiedad intrínseca dependiente de la composición nucleotídica, las regiones con alto contenido de guanina-citosina (G-C) presentan una estabilidad superior debido a la presencia de tres puentes de hidrógeno, en comparación con los dos presentes en los pares adenina-timina (A-T).

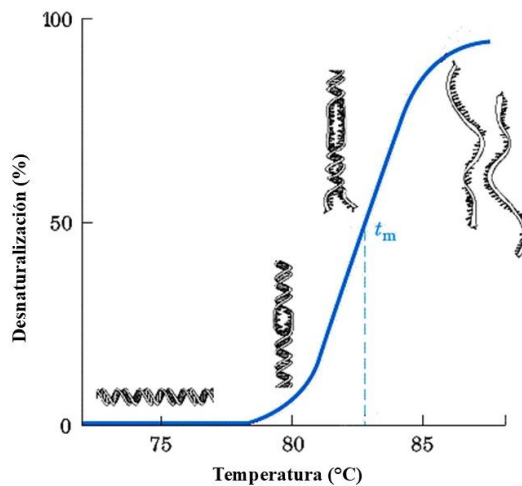


Figura 3.21. Desnaturalización y renaturalización del ADN.

La recuperación de la estructura bicatenaria, o renaturalización, es un proceso dependiente de la temperatura y la concentración de las hebras. El enfriamiento paulatino permite el reconocimiento de secuencias complementarias mediante colisiones aleatorias, restableciendo los puentes de hidrógeno de manera precisa; este fenómeno es la base fisicoquímica de la hibridación de ácidos nucleicos. Por lo contrario, si el ADN desnaturalizado se expone a temperaturas extremadamente bajas de forma inmediata (enfriamiento brusco o choque térmico), las hebras no logran encontrar sus secuencias complementarias a tiempo, quedando atrapadas en un estado monocatenario desordenado.

El principio de renaturalización es el pilar de la transferencia de información y el diagnóstico molecular. En técnicas como el *Southern blot* o la hibridación *in situ*, se utiliza la desnaturalización térmica para permitir que una sonda marcada se una específicamente a una secuencia blanco mediante hibridación.

Durante la replicación y la síntesis de ARN naciente, la enzima helicasa realiza una desnaturalización enzimática controlada para permitir que la polimerasa acceda al molde. La estabilidad de los híbridos temporales formados en la burbuja de transcripción está sujeta a los mismos valores de T_m y composición de bases discutidos anteriormente.



Reacción en cadena de la polimerasa: principio, etapas, variantes, usos

Esta sección se encuentra desglosada en la sección de fundamento teórico del Taller y TP

3.

TALLER Y TRABAJO PRÁCTICO n.º 3: PCR

OBJETIVOS

Los objetivos del taller n.º 3 son:

- Comprender los principios teóricos y moleculares de la PCR, analizando el papel de cada componente de la mezcla de reacción.
- Discutir las aplicaciones de la PCR en diversos campos de las ciencias biológicas y biomédicas.
- Identificar las limitaciones, fuentes de error y contaminaciones comunes en PCR.
- Promover el trabajo en equipo y la capacidad de transferir conceptos a situaciones de enseñanza futura.

Los objetivos del TP n.º 3 son:

- Adquirir destrezas prácticas para preparar mezclas de reacción de PCR.
- Familiarizarse con el manejo del termociclador y con la programación de ciclos térmicos y con la amplificación de un fragmento de ADN específico a partir de un molde.
- Integrar la práctica de PCR en aplicaciones reales de investigación, diagnóstico o docencia.

FUNDAMENTO TEÓRICO DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

La PCR es una técnica esencial en Biología Molecular que permite amplificar *in vitro* secuencias específicas de ADN a partir de cantidades mínimas de material genético. Es una técnica que ha revolucionado el manejo, clonación y detección de fragmentos de ADN, lo que le ha valido a su descubridor, K.B. Mullis, Premio Nobel de Química. Después de su descubrimiento en 1983, se ha convertido en una de las técnicas básicas de Biología Molecular, ampliamente utilizada por su rapidez, especificidad, flexibilidad y aplicabilidad, y, sobre todo, porque no es necesario contar con ADN extremadamente puro para amplificar. La PCR tiene aplicaciones en la investigación básica, el diagnóstico de enfermedades, el análisis forense, la biotecnología y la biomedicina.

La PCR parte de la premisa de que el ADN bicatenario puede desnaturalizarse, de manera que en cada una de sus hebras pueden alinearse oligonucleótidos diseñados (también denominados cebadores o *primers*) complementarios a regiones específicas de las cadenas molde. Cuando estos cebadores se sitúan en extremos opuestos de una región particular, sirven

como puntos de inicio para la ADN polimerasa, que sintetiza una nueva hebra complementaria, generando así un fragmento de ADN bicatenario definido por ambos cebadores.

El proceso comienza con una desnaturalización inicial, en la cual el ADN molde se separa completamente en sus dos hebras complementarias mediante la aplicación de calor. Luego se suceden múltiples ciclos de desnaturalización, alineamiento o hibridación (*annealing*) de los cebadores y extensión o elongación por acción de la polimerasa. Finalmente, una etapa de extensión final asegura que todas las moléculas sintetizadas queden completamente extendidas.

La repetición de estos ciclos de desnaturalización, hibridación y extensión produce una amplificación exponencial de la secuencia delimitada por los cebadores, generando millones de copias de un fragmento de ADN en pocas horas (aproximadamente entre 1,5 y 2,5 h). Por lo tanto, basta una cantidad mínima de ADN molde para obtener una gran cantidad de copias de la región de interés tras la reacción.

El número de copias de dicha región seleccionada (amplicones) se puede estimar según:

$$N = N_0 x (1 - R)^c$$

donde, N es el número de copias obtenidas;

N_0 es el número de copias que se han depositado en la reacción inicialmente;

R es el rendimiento de cada ciclo expresado en tanto por uno (normalmente debe oscilar entre 0,7 y 0,85);

c es el número de ciclos.

Etapas de la PCR

El proceso de PCR se basa en N ciclos (aproximadamente entre 30 y 40) repetidos, lo que genera 2^n copias de la región de interés del templado o secuencia blanco del ADN molde (**Figura 3.21**). La reacción comienza con una desnaturalización inicial, que asegura la completa separación de las hebras del ADN molde, y concluye con una extensión final, que permite completar la síntesis de todas las moléculas amplificadas.

Una reacción típica comienza con una desnaturalización inicial a 94–95 °C), por 3-4 min, que separa completamente las hebras de ADN molde. Cada ciclo subsiguiente consta de tres etapas:

1. Desnaturalización a 94–95 °C por 30 segundos, donde las dobles hélices recién formadas se separan.
2. Hibridación o alineamiento a 55-60 °C por 30 segundos, en la que los oligonucleótidos cebadores reconocen y se aparean específicamente con sus secuencias complementarias.

- Extensión o elongación a 72 °C por 1 min/kb, durante la cual la ADN polimerasa termoestable sintetiza nuevas hebras complementarias a partir de los cebadores.

Tras completarse el número estipulado de ciclos, la reacción culmina con una extensión final a 72 °C por 5–10 min, destinada a asegurar la terminación completa de todos los productos parcialmente extendidos.

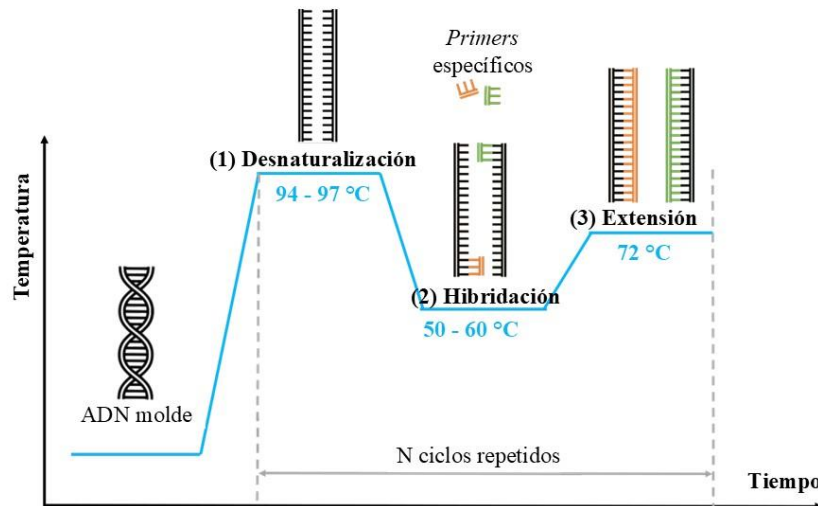


Figura 3.22. Esquema general de una PCR típica. La reacción comienza con una desnaturalización inicial a 94–95 °C por 3–4 min. Cada ciclo subsiguiente consta de tres etapas: (1) desnaturalización a 94–95 °C por 30 segundos; (2) hibridación a 50–65 °C por 30 segundos; y (3) una extensión a 72 °C por 1 min/kb. Tras completarse el número de ciclos, la reacción culmina con una extensión final a 72 °C por 5–10 min. Tomado de Biomnigene con modificaciones.

Desnaturalización del ADN. Un ciclo de PCR comienza con un calentamiento inicial a 94 – 95 °C o más para desnaturalizar el ADN objetivo o blanco (también llamado matriz, *template* o *target*). Este primer paso del ciclo dura entre 15 segundos a 2 minutos, donde las dos cadenas del ADN objetivo se separan una de la otra y permiten que la matriz se encuentre como cadena simple para que la polimerasa actúe durante la amplificación. La estabilidad de la reacción depende de un *buffer* adecuado y de la resistencia de la polimerasa al calor (ambas contenidas en la *master mix*).

Hibridación de oligonucleótidos específicos. En este paso del ciclo la temperatura se reduce a 40 – 60 °C. Los oligonucleótidos hibridan con la secuencia complementaria en cada una de las cadenas simples de ADN separadas en el paso anterior, y sirven como cebadores para la síntesis en el paso siguiente. La temperatura a la cual la mitad de las moléculas de ese oligonucleótido hibridan a su secuencia complementaria en el ADN molde y la otra mitad se encuentra desnaturalizada se conoce como temperatura de fusión (*T_m*, del inglés *Temperature of melting*). En términos prácticos, la *T_m* indica la estabilidad del apareamiento entre el cebador y la hebra de ADN. Una *T_m* baja implica que la unión es débil; una *T_m* alta indica una unión

más fuerte, pero si es demasiado elevada puede impedir la hibridación durante el ciclo de alineamiento de la PCR. La concentración de $MgCl_2$ en la *master mix* regula la eficiencia y especificidad de este apareamiento.

Extensión de la nueva hebra de ADN. Se inicia cuando la temperatura de la reacción llega al valor óptimo para la actividad de la polimerasa termoestable (incluida en la *master mix*); esta utiliza los dNTP para sintetizar la nueva cadena de ADN. Inicialmente se utilizaron ADN polimerasas que no eran estables a altas temperaturas y se desnaturalizaban junto al ADN, haciendo necesario añadir una nueva enzima tras cada ciclo. El hallazgo y la aplicación de ADN polimerasas termoestables facilitaron la metodología gracias a su estabilidad para resistir los repetidos ciclos a temperaturas altas y variables; posibilitaron que la PCR se convirtiera en una técnica rápida, automatizada y reproducible. Una de las enzimas más usadas y la que se utiliza en este TP es la *Taq* polimerasa, una ADN polimerasa termoestable que se aisló originalmente de la bacteria *Thermus aquaticus*, un microorganismo termófilo que vive en ambientes de muy alta temperatura. Esta enzima puede resistir temperaturas de hasta 95 °C, lo que la hace ideal para soportar las altas temperaturas durante la desnaturalización del ADN en los ciclos de PCR. Funciona de manera óptima alrededor de 72 °C, temperatura en la cual sintetiza nuevas hebras de ADN, al igual que otras ADN polimerasas termoestables. La síntesis puede durar entre 30 segundos y dos minutos, dependiendo del largo de la secuencia a amplificar, toma un minuto amplificar 1.000 pb o 1 kb. Este paso completa un ciclo, y el siguiente ciclo se inicia con el retorno a los 94–95 °C para la desnaturalización. La velocidad y fidelidad de este paso dependen de la enzima y del balance adecuado de nucleótidos.

El producto de PCR se acumula en función del número de ciclos, diferenciándose tres fases en función de la cantidad de producto amplificado (**Figura 3.22**) que depende de la disponibilidad de sustrato para la reacción. Por eso, los oligonucleótidos y los dNTP se añaden en exceso respecto al ADN a amplificar. La primera fase de la PCR se denomina fase exponencial o logarítmica; es la etapa inicial y más eficiente de la PCR. Cada ciclo duplica la cantidad de ADN blanco, por lo que la amplificación sigue una curva exponencial 2^n , donde n es el número de ciclos. La polimerasa funciona de forma óptima, los dNTP y cebadores están en exceso, y no hay productos que interfieran.

La segunda fase se llama fase lineal o desacelerada, en esta la eficiencia disminuye progresivamente. A medida que los ciclos de la PCR continúan, los reactivos comienzan a consumirse (cebadores, dNTP, ADN molde) y la polimerasa puede perder actividad. La

amplificación ya no es exponencial, la cantidad de producto aumenta de forma lineal, cada ciclo produce menos copias que el ciclo anterior. Es común la aparición de productos inespecíficos y subproductos si la reacción continúa demasiado.

La fase *Plateau* o meseta representa el punto en que la reacción de PCR llega a su límite natural debido al agotamiento de recursos y a la pérdida de eficiencia enzimática. Aunque el ADN amplificado sigue presente, ya no se genera producto nuevo de forma significativa, marcando el final útil de la reacción. La eficiencia es muy baja o nula y sucede debido a que se producen varios fenómenos que limitan la síntesis de nuevas cadenas. Los reactivos (dNTP y cebadores) se consumen casi por completo; la *Taq* polimerasa se desnaturaliza (es decir, pierde su actividad enzimática) luego de muchos ciclos a alta temperatura; las cadenas recién sintetizadas compiten con el molde original, y se forman estructuras secundarias que dificultan la unión de los cebadores; se acumulan productos inhibitorios como pirofosfato o productos inespecíficos que interfieren con la reacción. A este fenómeno se lo conoce como efecto *Plateau*.

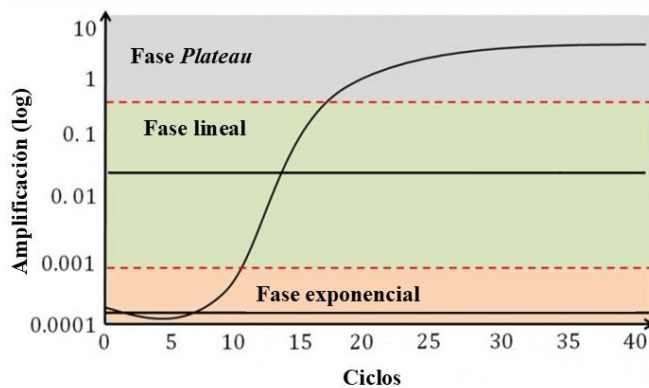


Figura 3.23. Fases en una PCR. El producto de PCR se acumula en función del número de ciclos, diferenciándose tres fases en función de la cantidad de producto amplificado: fase exponencial o logarítmica, etapa inicial y más eficiente de la PCR donde cada ciclo duplica la cantidad de ADN blanco; fase lineal o desacelerada donde la eficiencia disminuye progresivamente hasta llegar al máximo de amplificación representada por la fase *Plateau* o meseta la cual marca el final útil de la reacción.

Componentes de la PCR

Para llevar a cabo la PCR se necesita realizar una mezcla maestra o *master mix* la cual contiene todos los reactivos esenciales para desarrollar el número de reacciones determinadas. El propósito de mezcla es facilitar la preparación de la reacción, disminuir errores de pipeteo y asegurar que cada tubo de PCR tenga exactamente los mismos componentes y condiciones. A continuación, se resumen los componentes de la *master mix* y la función de cada uno de ellos.

1. *Buffer o tampón de reacción*: mantiene condiciones de pH y salinidad adecuadas para la actividad enzimática. Suele contener Tris-HCl, sales como KCl y detergente. Este último ayuda a disminuir la contaminación exógena. Se recomienda utilizar el buffer provisto por el fabricante de la enzima polimerasa, ya que está formulado para optimizar su actividad. La

concentración del *buffer* se representa por X que significa cantidad de veces concentrado. Por lo general el *buffer* que viene con la *Taq* polimerasa tiene una concentración 10 X, es decir, 10 veces concentrado respecto a la concentración final que se requiere en la reacción. La concentración final de *buffer* en el volumen de la reacción es 1 X. Para una reacción de volumen final de 20 μL , la *master mix* contendrá 2 μL de *buffer* por cada reacción.

2. *Cofactor MgCl₂*: el ion magnesio es el cofactor esencial para la actividad de la polimerasa. Regula la unión de los dNTP y la fidelidad de la reacción. La concentración del MgCl_2 debe optimizarse de manera empírica porque si es demasiado baja, hay poca amplificación; por lo contrario, si es demasiado alta, la amplificación resulta inespecífica. La solución de MgCl_2 también suele ser provista por el fabricante que comercializa la ADN polimerasa. Para calcular el volumen necesario para preparar la *master mix*, se debe tener en cuenta que la solución comercial de MgCl_2 suele tener una concentración de 25 mM. Por ejemplo, si se requiere una concentración final de 1 mM de Mg^{2+} por reacción, y el volumen total de la mezcla es de 20 μL , se deberá adicionar 1 μL de la solución de MgCl_2 comercial.

3. *Desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTP)*: son los bloques de construcción para la síntesis de las nuevas cadenas de ADN, dATP, dTTP, dCTP, dGTP. La polimerasa los incorpora complementariamente a la hebra molde. Usualmente, los dNTP se agregan a la *master mix* en exceso. Si se dispone de una solución de trabajo de dNTP a 2,8 mM y se desea una concentración final de 200 μM en cada tubo, para un volumen final de reacción de 20 μL , se deberán adicionar 1,4 μL de la solución de dNTP.

4. *Oligonucleótidos, cebadores o primers*: son secuencias cortas de ADN de 18 a 25 nucleótidos que hibridan específicamente con los extremos de la región a amplificar. Definen la especificidad de la PCR, ya que solo se amplifica el fragmento flanqueado por estos. Se necesitan al menos un par de cebadores para poder amplificar una región específica debido a que el ADN es bicatenario. Si se dispone de una solución de 10 μM de cada uno de los cebadores y se desea una concentración final de 0,5 μM en la mezcla de reacción, para un volumen final de 20 μL , se deberá adicionar 1 μL de cada cebador.

Después de la desnaturalización, donde las dos hebras complementarias del ADN se separan, la temperatura se reduce para permitir que los cebadores se unan por complementariedad a las regiones específicas del ADN molde. El cebador sentido, directo o izquierdo (*primer forward*) se une a la hebra molde 3' \rightarrow 5', en el extremo 3' del fragmento a amplificar, de modo que la ADN polimerasa pueda extenderse en dirección 5' \rightarrow 3', sintetizando

una nueva hebra complementaria en sentido “hacia adelante”. El otro cebador, el cebador antisentido, reverso o derecho (*primer reverse*) se une a la otra hebra del ADN, también en orientación 3' → 5', permitiendo que la polimerasa extienda en la dirección opuesta 5' → 3' (**Figura 3.23**). Esta unión ocurre gracias a puentes de hidrógeno entre bases nitrogenadas complementarias (A-T, G-C) según las reglas de Watson y Crick. La especificidad de la PCR depende directamente de la secuencia de los cebadores. Solo si estos encuentran regiones complementarias podrán hibridar y permitir la síntesis. Una vez hibridados, la *Taq* polimerasa reconoce el extremo 3'-OH libre del cebador como punto de inicio y comienza a añadir dNTP complementarios a la hebra molde, extendiendo la nueva cadena en dirección 5' → 3'. Una nueva hebra complementaria sintetizada a partir del cebador sentido y otra desde el cebador antisentido. En el siguiente ciclo, estas nuevas hebras también sirven como moldes, lo que lleva a la amplificación exponencial del fragmento específico.

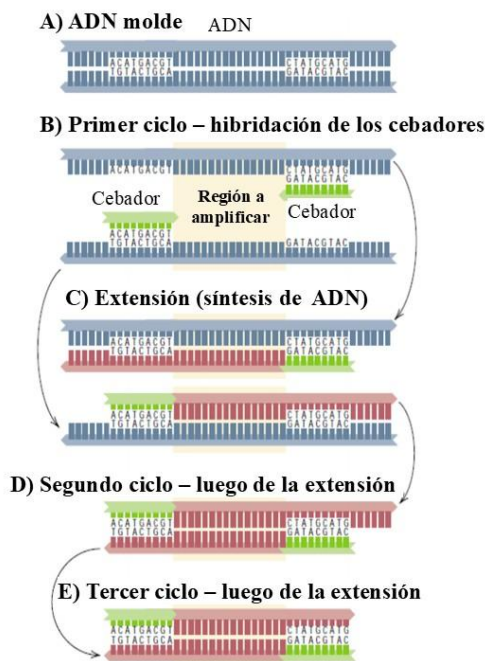


Figura 3.24. Rol de los cebadores en la PCR. A) En el ADN molde (azul) se muestran las secuencias blanco de los cebadores, las cuales flanquean la región a amplificar. B) Unión de los cebadores a sus secuencias blanco en el ADN desnaturizado. C) Primera ronda de amplificación, las hebras nuevas de ADN (en rosa) se extienden desde un sitio del cebador hasta más allá del otro sitio del cebador. D) Segundo ciclo de amplificación, se muestra solo una hebra. La nueva hebra se extiende desde y hasta los sitios de los cebadores. E) Tercer ciclo de amplificación, se muestra solo una hebra. Ambas secuencias se extienden desde y hacia los sitios de los cebadores, es decir, se delimita el fragmento a amplificar.

Los cebadores se solicitan en empresas las cuales sintetizan por síntesis química. Estos se proveen con características específicas: *T_m*, peso molecular, indicación del volumen de agua destilada estéril en el cual debe diluirse para una determinada concentración. Los cebadores se almacenan a -20 °C en alícuotas para evitar el descongelado frecuente.

5. *ADN polimerasa termoestable*: cataliza la elongación de la cadena de ADN a partir del oligonucleótido. Debe ser termoestable porque la PCR incluye ciclos de desnaturización a altas temperaturas. La *Taq* polimerasa es una de las enzimas más usadas, su temperatura óptima

es 72 °C. Al adquirir la *Taq* polimerasa, el fabricante indica el número de unidades de actividad en Unidades de actividad/ μL ($\text{U}/\mu\text{L}$); una unidad de esta enzima cataliza la incorporación de 10 nanomoles de dNTP a una fracción polinucleotídica (absorbida a una columna) en 30 minutos a 70 °C. La *Taq* polimerasa es provista en un vial conteniendo glicerol, que evita que se congele, pero también vuelve más densa a la solución, por lo que se debe observar con cuidado el volumen al pipetear. El número de unidades de *Taq* polimerasa a utilizar es otro factor que se ajusta de manera empírica, se recomienda utilizar entre 0,1 a 2 unidades por reacción de PCR. El exceso de enzima no asegura un aumento de rendimiento, pero puede significar el aumento de artefactos. En el caso de que se requieran 0,5 unidades de *Taq* polimerasa para la PCR y este vial contenga 5 $\text{U}/\mu\text{L}$, se debe agregar 0,1 μL por reacción de PCR.

6. *ADN molde (templado)*: es el material genético que contiene la secuencia de interés a amplificar. La calidad y pureza del ADN influyen directamente en el éxito de la reacción. El ADN aislado debe estar libre de inhibidores potenciales de polimerasas de ADN como solventes orgánicos, proteasas, alcoholes, detergentes y otros (usados en la extracción del ADN). La cantidad de ADN molde a agregar en la reacción es una variable que se debe optimizar, por lo que debe conocerse con la concentración del ADN molde. Se puede usar 1 μg de ADN y si se obtiene ADN en una concentración de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, se puede usar 1 μL de este. De todas maneras, la cantidad de ADN es otra variable que se optimiza de manera empírica.

7. *Agua libre de nucleasas*: la PCR se desarrolla en medio acuoso libre de ADNasas y ARNasas. Sirve como vehículo para completar el volumen final de la reacción. Garantiza que no haya degradación del ADN ni interferencias. La cantidad de agua a agregar a la *master mix* es igual a la diferencia entre el volumen final de la reacción y la suma de (volumen de *buffer* + volumen de MgCl_2 + volumen de dNTP + volumen de los cebadores + volumen de la ADN polimerasa + volumen del ADN molde).

También existen mezclas listas para usar que ya incluyen polimerasa, *buffer*, MgCl_2 y dNTP, a las que solo es necesario añadir el ADN molde y los cebadores. Esto reduce errores de pipeteo y asegura mayor reproducibilidad entre ensayos.

En este apartado es necesario explicitar que los resultados de la amplificación dependen no solo de la correcta ejecución técnica, sino también del uso adecuado de controles experimentales, entre los cuales los controles positivo y negativo son esenciales para la validación del ensayo. El control positivo consiste en una muestra que contiene ADN molde que fue amplificado anteriormente con los mismos cebadores. Su inclusión permite verificar

que todos los componentes de la reacción, condiciones térmicas y equipo funcionan correctamente. Si el control positivo no genera el producto esperado, se infiere que hubo un error técnico o fallo en alguno de los reactivos, por lo tanto, los resultados del experimento no pueden considerarse confiables. Además, este control sirve como referencia para comparar la intensidad de la amplificación y confirmar que la reacción se ha desarrollado dentro de parámetros normales.

Por otro lado, el control negativo es una reacción preparada con todos los componentes necesarios para la PCR, excepto el ADN molde. En su lugar, se le agrega agua libre de nucleasas. La función principal del control negativo es detectar posibles contaminaciones con ADN exógeno o productos de amplificaciones previas. Si el control negativo presenta una banda en el gel de agarosa, indica contaminación y compromete la interpretación de los resultados de las muestras analizadas.

La inclusión simultánea de ambos controles es indispensable, el control positivo asegura que la reacción funcione adecuadamente, mientras que el control negativo confirma la ausencia de contaminación. Su uso permite distinguir entre una ausencia real del ADN blanco y un resultado falso negativo por fallo técnico, así como entre una amplificación genuina y un falso positivo por contaminación. En conjunto, estos controles garantizan la validez, reproducibilidad y precisión de los resultados obtenidos por PCR.

Factores que influyen sobre la PCR

La PCR es altamente sensible, pero su éxito depende de múltiples variables que deben ser cuidadosamente controladas ya que muchas veces, se ajusta las condiciones para la máxima especificidad no se obtiene buen rendimiento, o se optimiza para la fidelidad y no se obtiene buena eficiencia. En consecuencia, cada vez que se optimiza una PCR hay que tener en cuenta distintos factores y que siempre se determinan empíricamente.

1. Diseño de los cebadores: cuando se trabaja con cebadores no universales o que no se han referenciado con anterioridad, se debe diseñarlos. Para ello, se ha demostrado que algunas reglas son útiles para que los mismos hibriden a la secuencia del ADN molde:

- Cada cebador debe tener de 18 a 24 bases.
- Los dos cebadores deben tener una T_m cercana, no deben diferir en más de 5 °C.
- Se debe mantener un contenido de G:C (guanina:citosina) entre 40 y 60 %. Es decir, de cada 10 bases que forman cada uno de los oligonucleótidos, 4 a 6 deben ser guaninas o citosinas).

- La secuencia de los cebadores individuales debe iniciarse y terminarse con 1 o 2 bases púricas (A o G), especialmente en el extremo 3' ya que es el extremo por donde la ADN polimerasa inicia la extensión). Una base púrica en esa posición proporciona mayor estabilidad en la unión cebador-ADN molde, en particular, la guanina que forma 3 puentes de hidrógeno en comparación con la adenina que forma solo 2. Esto mejora la fidelidad y disminuye productos secundarios. Si el extremo es poco estable (p. ej., termina en T o C mal apareada), la polimerasa puede perder el alineamiento correcto con la hebra molde provocando inserciones o deleciones de nucleótidos y una baja eficiencia en la elongación.

Existen programas informáticos que facilitan el diseño de cebadores, el *Primer3* es uno de los más utilizados por su precisión, versatilidad y disponibilidad gratuita que se estudiará en mayor profundidad en el capítulo 5 (Biomedicina).

2. *Concentración de MgCl₂*: en ausencia de concentraciones adecuadas del ión Mg⁺⁺ libre, la ADN polimerasa es inactiva. Por lo tanto, la concentración de magnesio es un factor crucial que afecta el desarrollo de la PCR. Muchos de los componentes de la reacción unen magnesio, incluyendo la matriz de ADN, agentes quelantes presentes en la muestra (EDTA o citrato), dNTP y proteínas. Como resultado, se puede ver afectada la cantidad de magnesio libre presente en la reacción. Por otro lado, el exceso de magnesio disminuye la fidelidad de la enzima y puede incrementar el nivel de amplificación no específica. Por lo tanto, para cada protocolo de amplificación por PCR se deben optimizar las concentraciones de MgCl₂ (esto se logra de manera experimental comparando el nivel de amplificación logrado con diferentes concentraciones de Mg⁺⁺, proceso conocido como titulación de Mg⁺⁺).

3. *Elección de la enzima*: la elección de la enzima correcta para ser usada en PCR depende de varios factores, pero por razones de automatización es preferible usar las termoestables. Sin embargo, no todas ellas son igualmente eficaces a la hora de amplificar. Si bien la *Taq* polimerasa es la más usada, esta enzima no posee la actividad correctora 3'-5' por lo que su tasa de error es elevada, del orden de 10⁻⁴ errores por par de bases incorporadas. En cambio, la *Pfu* polimerasa posee actividad de corrección 3'-5' por lo que su tasa de error es menor, del orden de 10⁻⁷.

4. *ADN molde*: se debe cuantificar el ADN para conocer la masa de ácidos nucleicos disuelta y su pureza, lo cual es fundamental para asegurar una amplificación eficiente. La cantidad de ADN puede expresarse en microgramos, nanogramos o picogramos, según el tipo de muestra y el objetivo del ensayo. Si se utiliza menos ADN del necesario, la reacción puede

generar una amplificación débil o indetectable, debido a la escasa disponibilidad de copias del fragmento objetivo. En cambio, si se agrega una cantidad excesiva de ADN, pueden aparecer productos inespecíficos o bandas múltiples, ya que el exceso de templado puede favorecer la unión inespecífica de los cebadores y la formación de estructuras secundarias que interfieren con la polimerasa. Por ello, la cuantificación previa del ADN y el ajuste adecuado de su concentración son pasos críticos para obtener resultados reproducibles y específicos en la PCR.

5. *Termocicladores*: se hallan disponibles un gran número de modelos de termocicladores y también de microtubos para PCR. Sin embargo, todos los termocicladores se caracterizan por poseer un bloque metálico, que se calienta o enfría, alcanzando temperaturas que son controladas por un programa de computación y determinadas por un sensor que las regula y mantiene de acuerdo con el programa. Pero a pesar de todo, los diferentes termocicladores tienden a obtener y mantener temperaturas de un modo levemente diferente, por lo que los resultados de la reacción pueden llegar a variar levemente. Por ello es necesario apropiarse los programas de ciclado a los cebadores y condiciones con los que se trabaje.

En el TP se trabaja con microtubos de paredes delgadas de 0,2 mL (tubos *thin wall*) cuya forma y estrechez de pared permiten un contacto perfecto entre los tubos y el bloque metálico del termociclador. Se debe tener en cuenta que el intercambio no uniforme de calor entre el termociclador y el microtubo de PCR puede provocar significativas variaciones en la amplificación.

Problemas asociados a la PCR

Contaminación

Para minimizar el problema de la contaminación, se sugiere seguir estrictamente las reglas de Kwok e Higuchi, donde se recomienda el uso de *tips* con filtro para los aerosoles, alicuotar los reactivos y trabajar en tres áreas físicamente separadas:

Área 1: donde se trabaja con los materiales para extraer el material genético.

Área 2: donde se preparan las soluciones de amplificación.

Área 3: donde se manipulan productos amplificados (ya sea provenientes de clones o de productos previos de PCR).

Se puede agregar el uso de juegos de micropipetas de manera separada para cada una de estas áreas.

Inhibición de la reacción

Como contrapartida a los falsos resultados positivos, es posible obtener resultados falsos negativos, los cuales pueden deberse a una extracción de ADN no eficiente o a la presencia de inhibidores de la PCR. Entre los inhibidores, se puede distinguir entre inhibidores en las muestras biológicas: hemoglobina o heparina en muestras de sangre, polifenoles y polisacáridos en muestras vegetales, proteínas celulares; inhibidores derivados del proceso de extracción como solventes orgánicos, alcoholes, o detergentes debido a una deficiente purificación del ADN; e inhibidores relacionados a la propia PCR con la reacción como exceso de EDTA (quelante de Mg^{2+} , impide la acción de la polimerasa); concentraciones inadecuadas de Mg^{2+} , uniones inespecíficas entre el ADN molde y los cebadores o la formación de dímeros.

La formación de dímeros es un fenómeno que ocurre cuando se aparean bases entre dos cebadores o entre los extremos de un mismo cebador. Este efecto suele observarse en reacciones de PCR con un número elevado de ciclos o cuando la concentración de ADN molde es muy baja. También puede producirse cuando existe una alta complementariedad entre los cebadores, lo que favorece la formación de dímeros durante los primeros ciclos térmicos, incluso en mayor proporción que el amplicón deseado. Esto puede evitarse colocando la ADN polimerasa por último cuando la reacción está ya a temperatura de desnaturalización ($94\text{ }^{\circ}\text{C}$), estrategia denominada *Hot Start* PCR. Pueden emplearse, además, enzimas que poseen un anticuerpo que bloquea su sitio catalítico impidiendo su acción hasta el momento en que la proteína se desnaturaliza.

El problema de los falsos negativos en las reacciones de PCR puede ser evaluado mediante la amplificación simultánea de un templado utilizado como control (positivo) interno de la PCR.

Cómo evitar los falsos positivos en la PCR

Aun cumpliendo las reglas de Kwok e Higuchi antes mencionadas, se puede transportar aerosoles de una muestra a otra con el consiguiente riesgo de obtener falsos positivos. Entre los procedimientos habitualmente empleados, la desinfección de superficies (mesadas, cabinas, pisos, paredes) con una solución de hipoclorito de sodio (NaOCl) o cloro activo 0,1 a 1 % (1.000 a 10.000 ppm) es un método muy apropiado para evitar las contaminaciones. Es aconsejable seguir las proporciones de la **Tabla 3.2** para conseguir la solución desinfectante adecuada.

La exposición con luz UV de 254 a 300 nm es suficiente para impedir la amplificación de amplicones no deseados. Esto provoca daños fotoquímicos en el ADN, como la formación de dímeros de timina y roturas en la cadena, que alteran su estructura e impiden que la ADN polimerasa lo utilice como molde durante la PCR. Dicha iluminación debería ser empleada una

vez concluida la operación con ácidos nucleicos. Es suficiente la aplicación durante 5 minutos. La luz UV no daña al ADN monocatenario de los oligonucleótidos. Es importante destacar que la solución de dNTP es capaz de absorber la luz UV y por ello no debe estar presente al momento de la irradiación. Tampoco debe irradiarse con luz UV al aceite mineral, pues podría afectar negativamente a la reacción.

Tabla 3.2. Solución de NaOCl aplicada a la desinfección de las áreas de trabajo del sector de amplificación de Biología Molecular.

| Objetivo de uso | % de NaOCl | Volumen de lavandina (5 %) | Volumen de agua | Volumen final | Aplicación |
|------------------------------------|------------|----------------------------|-----------------|---------------|---|
| Limpieza de superficies | 0,1 % | 20 mL | 980 mL | 1 L | Mesadas limpias |
| Desinfección de áreas trabajo | 0,5 % | 100 mL | 900 mL | 1 L | Superficies potencialmente contaminadas |
| Inactivación de fluidos biológicos | 1 % | 200 mL | 800 mL | 1 L | Superficies altamente contaminadas |

*El porcentaje de lavandina hace referencia a la cantidad de cloro.

Visualización de los productos de amplificación por PCR

Una vez completada la PCR, es fundamental verificar la presencia, el tamaño y la pureza de los productos amplificados. Para ello, se utilizan técnicas de separación electroforética, siendo las más comunes los geles de agarosa y los geles de poliacrilamida, que permiten observar el ADN en función de su tamaño molecular (**Figura 3.24**). La preparación de los geles de poliacrilamida se estudiará en mayor detalle en el TP siguiente (Taller y TP n.º 4. Técnicas para la detección de proteínas: electroforesis en geles de poliacrilamida y Western blot).

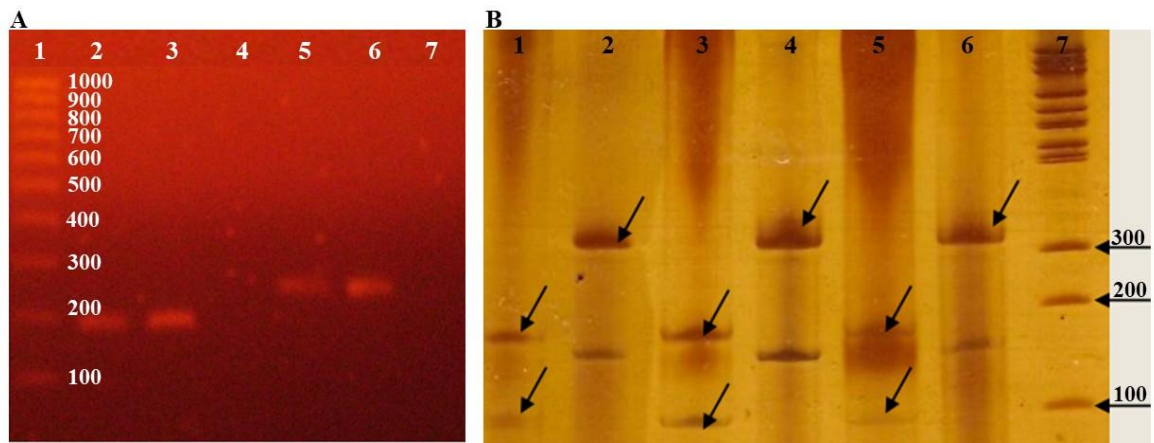


Figura 3.25. Productos de PCR en gel de agarosa 2 % (A) y en gel de poliacrilamida 8 % (B). A) Calle 1, marcador de peso molecular de 100 pb; calles 2 y 3, productos de amplificación de 192 pb; calle 4, control negativo; calles 5 y 6, productos de amplificación de 251 pb; calle 7, control negativo. B) Calles 1, 3 y 5, productos de amplificación de 90 y 180 pb; calles 2, 4 y 6, productos de amplificación de 160 y 310 pb; calle 7, marcador de peso molecular de 100 pb.

La electroforesis en gel de agarosa es la técnica más utilizada para analizar productos de PCR. La velocidad de migración depende principalmente del tamaño del fragmento de ADN, los fragmentos más pequeños avanzan más rápido a través de los poros del gel, mientras que los más grandes migran más lentamente. La concentración de agarosa puede ajustarse entre 0,8 % y 2 % según el tamaño esperado de los productos de PCR; se usan geles con baja concentración para fragmentos grandes y geles más concentrados permiten separar fragmentos pequeños con mayor resolución. Se utiliza además un marcador de peso molecular (*ladder*) para comparar y estimar el tamaño de los productos amplificados a través de rectas de calibración. Si se desea conocer el tamaño del producto de manera exacta para su uso en ciertos estudios, se debe recurrir a programas informáticos que se encargan de realizar una evaluación mucho más refinada.

Cuando se requiere mayor resolución para diferenciar fragmentos de ADN que difieren solo en unos pocos pares de bases, se emplean geles de poliacrilamida. Este tipo de gel forma una matriz con poros mucho más pequeños y uniformes que la agarosa, lo que permite una separación más precisa. La técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida puede aplicarse en condiciones nativas o desnaturizantes, dependiendo del objetivo. En el contexto de productos de PCR, se suele utilizar para análisis detallados, como la detección de mutaciones puntuales, la verificación de productos de secuenciación o estudios de polimorfismos.

Al igual que con la agarosa, tras la corrida los productos se visualizan mediante colorantes fluorescentes o tinciones específicas para ADN. Los geles de poliacrilamida ofrecen la ventaja de permitir la detección de diferencias mínimas en tamaño y conformación, aunque su

manipulación es más delicada y su preparación más compleja. En la **Tabla 3.3** se detallan las diferencias entre ambas formas de visualizar los productos de PCR.

Tabla 3.3. Visualización de productos de PCR en geles de agarosa y poliacrilamida

| Característica | Geles de agarosa | Geles de poliacrilamida |
|----------------------|----------------------------------|--|
| Resolución | Media | Alta |
| Tamaño de fragmentos | 100 pb – 20 kb | 5 – 1000 pb |
| Facilidad de uso | Alta (preparación simple) | Media-baja |
| Aplicación | Verificación de productos de PCR | Análisis fino, detección de pequeñas diferencias |

La cantidad de pares de bases del producto es igual a la cantidad de pares de bases de la región diana de amplificación teniendo en cuenta las bases de los cebadores. Si por ejemplo se desea amplificar una región de 450 pb, utilizando dos cebadores de 18 bases cada uno. El producto de amplificación tendrá 450 pb, incluyendo a los cebadores (no 414 pb, lo que hubiera significado restar los 36 pares de bases de los dos cebadores). Es necesaria esta aclaración al momento de evaluar la calidad del producto de amplificación a través de una corrida electroforética, ya sea en agarosa o en poliacrilamida.

La correcta interpretación del patrón de bandas proporciona información valiosa sobre la eficiencia de la amplificación y los cambios de los parámetros que se deben realizar para optimizar la reacción. En la **Figura 3.25** se describen las principales situaciones que pueden observarse y su significado. Las bandas definidas e intensas ubicadas en el tamaño esperado según el marcador de peso molecular indican que la PCR fue exitosa. Los cebadores hibridaron correctamente con la secuencia blanco, la reacción fue específica y la cantidad de ADN amplificado fue suficiente para su detección. La presencia de una banda única no tan intensa en el sitio esperado indica que la concentración del producto de amplificación no fue lo suficientemente alta. Se puede solucionar al aumentar la concentración de $MgCl_2$ o la cantidad de ciclos. Múltiples bandas inespecíficas bien definidas en posiciones diferentes al tamaño esperado indican que los cebadores se unieron a secuencias similares, pero no idénticas, lo que generó productos no deseados. Pueden deberse a una temperatura de hibridación demasiado baja, lo que permite uniones inespecíficas; diseño inadecuado de cebadores; contaminación cruzada con ADN ajeno. Posibles soluciones son aumentar la temperatura de hibridación, rediseñar los cebadores o ajustar concentraciones. La ausencia de banda o bandas difusas o

"*smearing*" (una franja continua o difusa a lo largo del gel) en lugar de una banda definida, suele indicar degradación del ADN molde, amplificación inespecífica, o presencia de inhibidores que afectan la actividad de la polimerasa. Puede deberse a un ADN molde de mala calidad o degradado, demasiados ciclos de amplificación lo que genera productos secundarios, exceso o déficit de $MgCl_2$ u otros componentes de la reacción, contaminación con ADN genómico o productos anteriores de PCR.

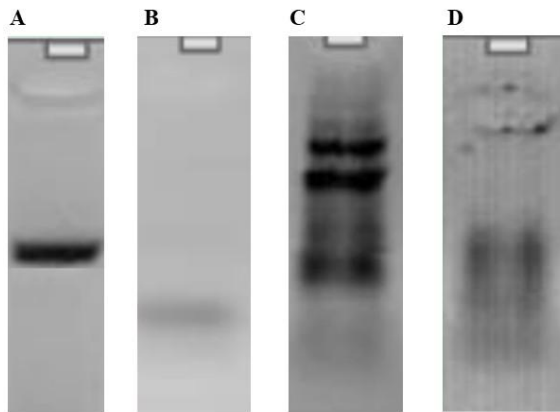


Figura 3.26. Posibles resultados de productos de PCR. A) Banda intensa, si el producto tiene el peso esperado, significa que la PCR funcionó de manera correcta. B) Banda difusa, significa que hubo falta de actividad en la reacción. C) Productos inespecíficos, resultado de problemas con el ajuste de la especificidad de reacción. En el caso anterior y en este, se necesita ajustar parámetros del ciclado y componentes de la *master mix*. D) Ausencia de banda, puede significar una degradación de la muestra.

TALLER n.º 3: PCR

Contenidos a desarrollar

- Hibridación. Principios teóricos y moleculares de la PCR, analizando el papel de cada componente de la mezcla de reacción.
- Limitaciones, fuentes de error y contaminaciones comunes en la PCR.
- Integración de la práctica de PCR con aplicaciones reales en investigación, diagnóstico o docencia.

Plan de actividades

Parte I

1. Momento de lectura comprensiva (individual)

Leer los contenidos teóricos de cada uno de los puntos mencionados arriba. Bibliografía Recomendada: Biología Molecular e Ingeniería Genética, Conceptos, Técnicas y Aplicaciones en Ciencias de la Salud. Autor: José Luque y Ángel Herráez. Ed. Harcourt, S.A. Madrid, España, Cap. 15.

2. Momento grupal

Calcular los volúmenes por reacción de los siguientes ejemplos de PCR en la **Tabla 3.4**. Completar las columnas vacías con los correspondientes volúmenes de los reactivos teniendo en cuenta la concentración inicial y final de cada uno de ellos; y el volumen final de cada PCR.

Tabla 3.4. Ejercicio de cálculos para una *master mix* de 3 reacciones de PCR con volúmenes y concentraciones de reactivos diferentes.

| Reactivos | CI | CF PCR 1 | VF PCR 1 | CF PCR 2 | VF PCR 2 | CF PCR 3 | VF PCR 3 |
|--|-----------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Agua | | | VF=20 µL | | VF=25 µL | | VF=50 µL |
| Buffer | 10X | 1X | | 1X | | 1X | |
| MgCl ₂ | 25 mM | 1,5 mM | | 3,5 mM | | 6 mM | |
| dNTP | 2,8 mM | 200 µM | | 100 µM | | 200 µM | |
| Cebador sentido | 10 µM | 0,5 µM | | 0,3 µM | | 0,7 µM | |
| Cebador antisentido | 10 µM | 0,5 µM | | 0,3 µM | | 0,7 µM | |
| Taq polimerasa | 5 U/µL | 0,5 U | | 1 U | | 2 U | |
| Separar la cantidad correspondiente a cada tubo y recién agregar el ADN molde a cada tubo | | | | | | | |
| ADN molde | 150 ng/µL | 150 ng | | 150 ng | | 150 ng | |

CI: concentración inicial; CF: concentración final; VF: volumen final

Ejemplo de cómo calcular los volúmenes finales de cada componente por reacción de volumen final de 20 μL y para la *master mix* teniendo en cuenta que se realizarán 3 reacciones (muestra, control positivo y control negativo).

Buffer

Cálculo para una reacción:

$$V1 * Ci = Vf * Cf$$

$$? * 10X = 1X * 20 \mu\text{L}$$

$$? = \frac{1X * 20 \mu\text{L}}{10X}$$

$$10X$$

$$? = 2 \mu\text{L}$$

Cálculo para 3 reacciones:

$$2 \mu\text{L} * 3 = 6 \mu\text{L}$$

dNTP

Cálculo para una reacción:

$$V1 * Ci = Vf * Cf$$

$$? * 2,8 \text{ mM} = 200 \mu\text{M} * 20 \mu\text{L}$$

$$? = \frac{200 \mu\text{M} * 20 \mu\text{L}}{2800 \mu\text{M}}$$

$$2800 \mu\text{M}$$

$$? = 1,4 \mu\text{L}$$

Cálculo para 3 reacciones:

$$1,4 \mu\text{L} * 3 = 4,2 \mu\text{L}$$

Taq polimerasa

Cálculo para una reacción:

$$5 \text{ U} \dots\dots\dots \text{ hay en } 1 \mu\text{L}$$

$$0,5 \text{ U} \dots\dots\dots = ?$$

$$? = \frac{0,5 \text{ U} * 1 \mu\text{L}}{5 \text{ U}}$$

$$5 \text{ U}$$

$$? = 0,1 \mu\text{L}$$

Cálculo para 3 reacciones:

$$0,1 \mu\text{L} * 3 = 0,3 \mu\text{L}$$

MgCl₂

Cálculo para una reacción:

$$V1 * Ci = Vf * Cf$$

$$? * 25 \text{ mM} = 1,5 \text{ mM} * 20 \mu\text{L}$$

$$? = \frac{1,5 \text{ mM} * 20 \mu\text{L}}{25 \text{ mM}}$$

$$25 \text{ mM}$$

$$? = 1,2 \mu\text{L}$$

Cálculo para 3 reacciones:

$$1,2 \mu\text{L} * 3 = 3,6 \mu\text{L}$$

Cebadores sentido y antisentido

Cálculo para una reacción:

$$V1 * Ci = Vf * Cf$$

$$? * 10 \mu\text{M} = 0,5 \mu\text{M} * 20 \mu\text{L}$$

$$? = \frac{0,5 \mu\text{M} * 20 \mu\text{L}}{10 \mu\text{M}}$$

$$10 \mu\text{M}$$

$$? = 1 \mu\text{L}$$

Cálculo para 3 reacciones:

$$1 \mu\text{L} * 3 = 3 \mu\text{L}$$

Agua

Cálculo para una reacción:

$$\Sigma = 6 \mu\text{L} (\text{buffer}) + 3,6 \mu\text{L} (\text{MgCl}_2) + 4,2 \mu\text{L} (\text{dNTP}) + 1 \mu\text{L} (\text{cebador sentido}) + 1 \mu\text{L} (\text{cebador antisentido}) + 0,6 \mu\text{L} (\text{Taq})$$

$$\Sigma = 12,56 \mu\text{L}$$

$$\text{Agua} = 20 \mu\text{L} - 6,7 \mu\text{L}$$

$$\text{Agua} = 13,3 \mu\text{L}$$

Cálculo para 3 reacciones:

$$13,3 \mu\text{L} * 3 = 39,9 \mu\text{L}$$

Responder las siguientes preguntas:

- ¿Qué etapas tiene el ciclo de PCR? ¿Cómo sería un ciclado estándar de PCR?
- ¿Qué factores pueden afectar a la amplificación de la PCR?
- ¿Cómo pueden afectar la concentración de cloruro de magnesio, dNTP, cebadores y el ADN molde en la PCR?
- En las siguientes secuencias de ADN, indique el sentido de la hebra. Solo se muestra una de las hebras, por lo cual deberán imaginar la complementaria. Escriba las secuencias correspondientes al par de cebadores (los sitios de estos se muestran en negrita y subrayados) para los amplicones indicados, recordando el sentido convencional de escritura de las secuencias. Finalmente, determine el tamaño del fragmento amplificado resultante de la PCR:

GTACCATGGCCACATGTCTGGCGGGCAGGCAGAGACGCTGCTGCAG
GCCAAGGGCGAGCCCTGGACGTTTCTTGTGCGTGAGAGCCTCAGCCA
GCCTGGAGACTTCGTGCTTTCTGTGCTCAGTGACCAGCCCAAGGCTGG
CCCAGGCTCCCGCTCAGGGTCACCCACAT**CAAGGTCATGTGCGAG GTAAGG**

Cebador sentido:

Cebador antisentido:

Fragmento amplificado:

GTCAACTTCTTAGGGGTCAAAGTATGTGCTTTTTGAAGCCACAGCCCTC
CCCGACATGTGCGTCAGCAGATGATGGCTGAACCCAAACCCTTCCCTACT
ATTGAAAAACAACCTCAAAAAGTCTGCACACTGATGAGGAACTCTAGAGCT
TAATGTTGATGTGGAAAGATAATACATTTTTCAATTAAGAGTATGTCTGAG
AGGCTAAACCAGAAATGTGTAAATTTGGTGAGACTTTAAACAGCCTGTGAC
CGACGGG**CCAATCTTCCTCTTTTCCTTCCA**GATGTCACACTG

Cebador sentido:

Cebador antisentido:

Fragmento amplificado:

**GCTGGCTGGAACTAGCCTAAGACTGAAAAGCAGCCATGGACATGGCGG
ATGAGCCACTCAATGGAAGTCAACCATGGCTATCCATTCCATTTGACCTCA
ATGGCTCTGTGGTGTCAACCAACACCTCAAACCAGACAGAGCCGTACTAT
GACCTGACAAGCAATGCAGTCCTCACATTCATCTATTTTGTG**GTCTGCATC**
ATTGGGTTGTGCCCGTAGTTTCCGATCCAATG**

Cebador sentido:

Cebador antisentido:

Fragmento amplificado:

- Si enviaras a sintetizar un par de cebadores, ¿escribirías la secuencia nucleotídica de 1 o las 2 hebras?

Actividad propuesta para la práctica docente

Se propone como actividad complementaria a la práctica para sus futuros estudiantes trabajar con el simulador LabXchange, <https://www.labxchange.org/>. En este simulador encontrarán una aplicación interactiva que les permitirá abordar el tema de PCR y sus aplicaciones: [Aplicaciones de la PCR - LabXchange](#) [Gel Electrophoresis - LabXchange](#). Tiene tres niveles, para usuarios principiantes hasta avanzados en la técnica. Este material interactivo recorre el proceso desde el aislamiento del material genético hasta la secuenciación de los amplicones; también presenta varias aplicaciones de la técnica PCR. Además de pensarse como una actividad complementaria para los estudiantes, también puede pensarse como único recurso en el caso de que los futuros docentes no cuenten con laboratorios preparados para llevar a cabo este tipo de técnicas.

Fecha de entrega: próxima clase de Taller n.º 4. Los mapas conceptuales elaborados deberán ser entregados en la sección correspondiente denominada *Actividades Taller TP n.º 3* del aula virtual en un archivo Word conteniendo una carátula con los integrantes del grupo.

TRABAJO PRÁCTICO n.º 3: PCR

Equipamiento y materiales

- Termociclador
- Tubos para PCR de 0,2 mL
- Micropipetas automáticas
- Puntas (*tips*) amarillas y blancas nuevas con filtros
- Gradillas para microtubos de 0,2 mL previamente enfriadas

Reactivos

- Solución tampón para PCR conteniendo KCl 10 X
- Solución de MgCl₂ 25 mM
- Taq polimerasa 5 U/μL
- Par de cebadores
- Solución de dNTP 10 mM
- Agua destilada esterilizada libre de ADN_s y ARN_s
- Matriz de ADN. En este TP se usa el ADN aislado en el TP n.º 1.

Procedimiento

Cálculo de las concentraciones y cantidades de los reactivos de la master mix

1. Cuando se realizan reacciones de PCR, se parte de una solución que contiene todos los reactivos que requiere la polimerasa para sintetizar el ADN, menos el ADN molde, el cual se agregará luego. Se selecciona esta metodología debido a las mínimas cantidades que se usan de cada uno de los reactivos, lo que acarrea graves errores de medición. Para sortear este inconveniente, se suman varias reacciones y se realiza una gran mezcla que contenga un mayor volumen. Para ello, se puede usar la **Tabla 3.5** para registrar los reactivos de la *master mix* y las condiciones de la PCR. El orden en el que se encuentran los reactivos en la tabla es el en el que se deben agregar en la *master mix*.
2. La *master mix* se prepara en un microtubo, previo a colocarse guantes antes de iniciar la práctica para evitar contaminación con las ADN_s y ARN_s del ambiente y de las manos del operador.

Nota: el laboratorio donde se lleven las reacciones a cabo y donde se encuentre el termociclador debe encontrarse separado de donde se realice la extracción de ADN para evitar contaminación cruzada con ácidos nucleicos.

Tabla 3.5. Reactivos de la *master mix* y condiciones de la PCR.

| Reactivos | Concentración inicial | Concentración final | 1 reacción | 3 reacciones |
|---|-----------------------------|----------------------------------|----------------------|--------------------|
| Agua | - | - | 13,7 μL * | 41,1 μL |
| <i>Buffer</i> | 10X | 1X | 2 μL | 6 μL |
| MgCl ₂ | 25 mM | 1,5 mM | 0,8 μL | 2,4 μL |
| dNTP | 2,8 mM | 200 μM | 0,4 μL | 1,2 μL |
| <i>Cebador</i> sentido | 10 μM | 0,5 μM | 1 μL | 3 μL |
| <i>Cebador</i> antisentido | 10 μM | 0,5 μM | 1 μL | 3 μL |
| <i>Taq</i> polimerasa | 5 U/ μL | 0,5 U | 0,1 μL | 0,3 μL |
| Preparar la cantidad correspondiente a cada tubo y recién agregar el ADN molde a cada tubo | | | | |
| ADN molde | 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ | 1 μg (cantidad total) | 1 μL | ** |

*Se suma el volumen de todos los reactivos (incluyendo del ADN molde) y se resta al volumen final de la reacción, en este caso 20 μL .

**Se agrega 1 μL a cada microtubo, no a la *master mix*.

- Luego de preparar la *master mix*, se reparte 19 μL de esta en la cantidad de microtubos correspondientes. En el microtubo de la muestra se añade 1 μL de ADN molde completando los 20 μL de volumen final de la reacción. En el microtubo del control positivo se añade 1 μL de ADN comprado o que se sabe que amplificó en reacciones anteriores completando los 20 μL de volumen final. En el microtubo del control negativo se añade 1 μL de agua completando los 20 μL de volumen final.

Nota: las reacciones de PCR pueden tener un volumen final de 20 a 50 μL . En este TP se preparan reacciones de 20 μL de volumen final.

- Los microtubos se colocan en el termociclador bajo condiciones.

Reflexión para la práctica docente

La práctica de PCR ofrece una excelente oportunidad para que los futuros docentes reflexionen sobre cómo acercar los procesos moleculares a los estudiantes de distintos niveles educativos. Más allá de su aplicación técnica, la PCR puede presentarse como una herramienta para comprender cómo la ciencia moderna identifica organismos, diagnostica enfermedades o investiga la biodiversidad. En el aula, este contenido puede integrarse a través de modelos didácticos, simulaciones virtuales o análisis de casos reales que conecten la biología molecular con problemáticas cotidianas y sociales.

Como educadores en formación, es importante pensar cómo traducir un procedimiento complejo en una experiencia significativa, fomentando la curiosidad científica y el pensamiento

crítico. La reflexión docente implica también considerar aspectos éticos del uso de técnicas moleculares, la importancia del trabajo seguro en el laboratorio y la valoración del método científico como proceso de indagación y construcción de conocimiento.

BIBLIOGRAFÍA

- Alberts, B.; Bray, D.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K. & Watson, J. D. *Molecular Biology of the Cell*. 3rd ed. New York and London: Garland Publishing; 1994.
- Aplicaciones de PCR. LabXchange.
https://www.labxchange.org/library/items/lb:LabXchange:8a3f7c27:lx_simulation:1
(Subido y actualizado 05/05/2020; consultado: 25/09/2025).
- Brown, T. A. *Genomes*. 2nd ed. Oxford, UK: BIOS Scientific Publishers Ltd; 2002.
- Campbell, N. A.; Reece, J. B.; Urry, L. A.; Cain, M. L.; Wasserman, S. A.; Minorsky, P. V. & Jackson, R. B. (2014). *Biología* (10.^a ed.). Pearson Educación.
- Cariaga Martínez, A. & Zapata, P. D. (2007). *El laboratorio de Biología Molecular*. Edición ampliada. Editorial Universitaria de Misiones.
- [PCR - Biomnigene](#) (Consultado: 29/09/2025).
- Griffiths, A. J. F.; Gelbart, W. M.; Miller, J. H. & Lewontin, R. C. *Modern Genetic Analysis*. New York: W. H. Freeman & Co.; 1999.
- Lodish, H.; Berk, A.; Zipursky, S. L.; Matsudaira, P.; Baltimore, D. & Darnell, J. E. *Molecular Cell Biology*. 4th ed. New York: W. H. Freeman & Co.; 1999.
- Nussbaum, R. L., McInnes, R. R., & Willard, H. F. (2016). *Thompson & Thompson. Genética en Medicina* (8^a ed.). Elsevier.
- Strachan, T. & Read, A. P. *Human Molecular Genetics 2*. 2nd ed. Oxford, UK: BIOS Scientific Publishers Ltd; 1999.
- <https://i0.wp.com/tuguideaprendizaje.co/wp-content/uploads/2021/05/burbuja-de-replicacion-del-ADN.webp?resize=617%2C403&ssl=1> (Consultado: 05/03/2026).

CAPÍTULO 4. BASES MOLECULARES DE LA TRANSCRIPCIÓN

ASPECTOS MOLECULARES DE LA TRANSCRIPCIÓN

El dogma central de la biología molecular fue propuesto originalmente por Francis Crick para describir el flujo unidireccional de la información genética dentro de la célula. Este garantiza que las instrucciones contenidas en el ADN se preserven y se manifiesten en estructuras funcionales; en la replicación, el ADN se duplica para transmitir la información a las células hijas; luego, en la transcripción, se sintetizan diferentes tipos de ARN utilizando el ADN como molde; y en la traducción, el ARN mensajero (ARNm) es decodificado por los ribosomas para sintetizar una secuencia específica de aminoácidos, dando lugar a la proteína como producto génico final.

Con el avance del conocimiento, este modelo fue ampliado para incorporar excepciones y mecanismos adicionales de flujo de información genética. Entre ellos se encuentra la transcripción inversa, en la cual la información fluye desde ARN hacia ADN, proceso característico de los retrovirus y mediado por la enzima transcriptasa inversa; también se reconoce la replicación de ARN a partir de ARN en algunos virus de ARN, mediante ARN polimerasas dependientes de ARN. Asimismo, se ha demostrado que muchos ARN cumplen funciones regulatorias y estructurales sin ser traducidos a proteínas, como los microARN, ARN largos no codificantes y ARN ribosomales. Estas modificaciones no invalidan el dogma central, sino que lo amplían, mostrando que el flujo de la información genética es más diverso y complejo de lo que se planteó originalmente, aunque la transferencia de información desde proteínas hacia ácidos nucleicos no ocurre.

Estructura y función de los genes

Se define gen a la unidad física y funcional de la herencia, consistente en una secuencia de nucleótidos que contiene la información necesaria para la síntesis de un producto génico (ARN o proteína). Estructuralmente, un gen se divide en dos regiones principales. La región reguladora contiene las secuencias (promotores) que determinan cuándo y cuánto se debe transcribir el gen. La región estructural contiene la secuencia que será efectivamente transcrita.

Diferencias entre procariotas y eucariotas

En la **Figura 4.1** se observan esquemas simplificados de un gen procariota y de un gen eucariota. En procariotas, son frecuentes los genes policistrónicos, lo que significa que una sola unidad de transcripción contiene información para varias proteínas distintas. Su región

estructural carece de interrupciones, estando formada exclusivamente por secuencias codificantes (exones) (**Figura 4.1a**). En contraste, en eucariotas, son predominantes los genes monocistrónicos (un gen → una proteína). Su región estructural es discontinua, compuesta por exones (codificantes) e intrones (regiones no codificantes que se eliminan). Además, presentan regiones UTR (del inglés, *untranslated regions*) en los extremos que, aunque se transcriben, no se traducen (**Figura 4.1b**).

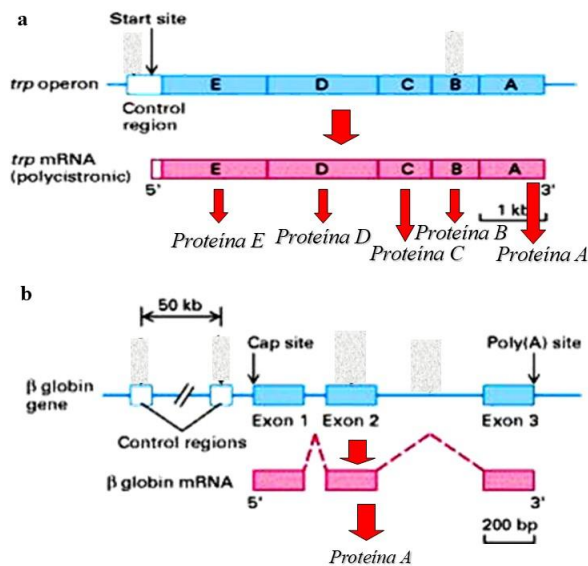
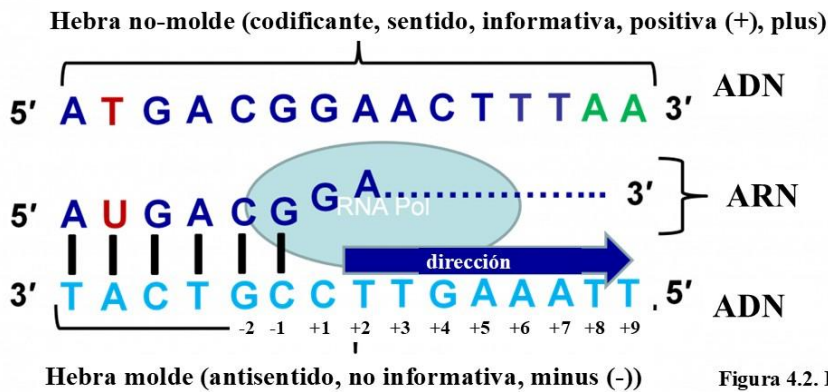


Figura 4.1. Diferencias entre genes procariontas y eucariotas. a) Esquema de gen procarionta. b) Esquema de gen eucariota.

Transcripción

La transcripción es un proceso asimétrico donde solo una de las dos hebras de ADN sirve como guía (**Figura 4.2**):

- Hebra molde, también llamada hebra no informativa o antisentido o negativa: es la cadena de ADN que la ARN polimerasa "lee" físicamente para sintetizar el ARN complementario.
- Hebra codificante, también llamada hebra informativa o sentido o positiva: es la cadena que contiene el gen, el mensaje genético legible. Es la hebra opuesta a la hebra molde. Su secuencia de nucleótidos es idéntica a la del ARN recién sintetizado (sustituyendo la timina por uracilo).



Para localizar secuencias dentro de un gen, se utiliza un sistema de coordenadas basado en el sitio de inicio de la transcripción (Figura 4.2):

- Sitio +1: Es el primer nucleótido que se transcribe. Las secuencias en dirección se denominan corriente o río abajo (*downstream*) y se numeran positivamente.
- Sitio -1: Es el nucleótido inmediatamente anterior al inicio. Las secuencias en esa dirección se denominan corriente o río arriba (*upstream*) y se numeran negativamente. No existe la posición cero.

Finalmente, aunque la mayoría de los genes ocupan loci distintos y no se superponen, existen los genes solapantes. En este fenómeno, una misma secuencia de ADN puede codificar para más de un producto génico dependiendo del marco de lectura o de la hebra que se utilice, optimizando así el espacio en genomas particularmente compactos.

El estudio de la expresión génica y los mecanismos mediante los cuales se interpreta la información del genoma ha revelado diferencias fundamentales en la compartimentación y temporalidad entre los procariotas y eucariotas. Debido a la ausencia de una envoltura nuclear que segregue el material genético del resto de los componentes celulares, los organismos procariotas exhiben un proceso de expresión génica extremadamente eficiente y continuo. En estos organismos, los procesos de transcripción y traducción ocurren de manera simultánea en el mismo compartimento celular. Un ARNm puede comenzar a ser traducido por los ribosomas incluso antes de que la ARN polimerasa haya finalizado su síntesis. Esta ausencia de barreras físicas elimina cualquier latencia entre la transcripción del mensaje y la producción de la proteína funcional.

A diferencia de los procariotas, las células eucariotas presentan una estricta segregación funcional mediada por la presencia del núcleo celular, lo que introduce una distinción clara entre la síntesis y la interpretación del mensaje genético. Existe una separación espacial porque

la transcripción se localiza exclusivamente en el nucleoplasma, donde el ADN sirve de molde para generar un transcrito primario o pre-ARNm. Por otro lado, la traducción se restringe al citoplasma (o al retículo endoplasmático rugoso). Asimismo, existe una separación temporal; esta diferencia cronológica es obligada porque antes de ser exportado al citoplasma, el pre-ARNm debe atravesar un proceso de maduración o procesamiento postranscripcional (que incluye la adición de la caperuza 5', la cola poli-A y el *splicing* de intrones). Solo una vez que el ARNm se considera "maduro", atraviesa los poros nucleares para encontrarse con la maquinaria ribosomal en el citosol.

Enzimología

En los organismos eucariotas, la transcripción está mediada por tres tipos principales de ARN polimerasas nucleares, cada una especializada en la síntesis de diferentes clases de ARN. Esta especialización es fundamental para la compartimentación y regulación de la expresión génica. En la **Tabla 4.1** se detalla la clasificación de estas enzimas, su localización en la célula y sus respectivos productos génicos.

Tabla 4.1. ARN polimerasas en eucariotas.

| Enzima | Localización | Productos Principales |
|-------------|--------------|-----------------------|
| ARN Pol I | Nucléolo | ARNr (5,8S; 28S; 18S) |
| ARN Pol II | Nucleoplasma | ARNm y ARNsn |
| ARN Pol III | Nucleoplasma | ARNt, ARNr 5S y ARNsn |

ETAPAS DE LA TRANSCRIPCIÓN

El proceso de transcripción representa la primera etapa de la expresión génica, donde la información codificada en el ADN se transfiere a una molécula de ARN. Este fenómeno ocurre dentro de una estructura dinámica denominada burbuja de transcripción (**Figura 4.3**). La transcripción es un proceso asimétrico, selectivo y se encuentra finamente regulado por proteínas específicas denominadas factores de transcripción, que facilitan el reclutamiento de la ARN polimerasa en regiones específicas del ADN. Aunque el ADN es una doble hélice, solo una de sus hebras participa activamente como guía para la síntesis. Esta es la hebra molde, la cadena con orientación 3' → 5' que la ARN polimerasa utiliza para el apareamiento de bases. La otra hebra, con orientación 5' → 3', es la codificante, la que tiene el mensaje. La síntesis del nuevo transcrito de ARN progresa estrictamente en dirección 5' → 3'.

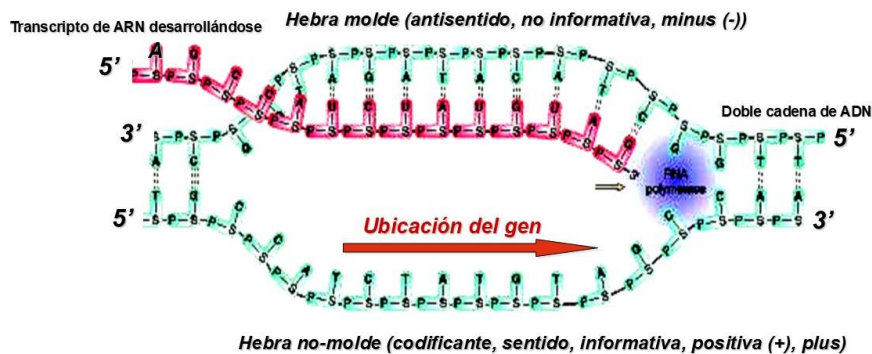


Figura 4.3. Burbuja de transcripción.

Primera etapa de la transcripción: inicio o iniciación

La primera etapa de la transcripción es la iniciación. Es la fase crítica donde se determina el sitio exacto de comienzo.

En procariotas, la ARN polimerasa se organiza como una holoenzima compuesta por un núcleo catalítico (*core*) y un factor sigma. Este factor es el responsable del reconocimiento específico de las secuencias promotoras en el ADN. Tras la síntesis de los primeros nucleótidos, el factor sigma se disocia, permitiendo que el núcleo enzimático prosiga con la elongación de manera autónoma.

El inicio en eucariotas es significativamente más complejo y requiere la formación de un complejo de preiniciación (**Figura 4.4**). Intervienen factores de transcripción basales que reconocen secuencias específicas como la caja TATA; helicasas para desnaturalizar el ADN y formar la burbuja de transcripción, y topoisomerasas que alivian la tensión torsional. La ARN polimerasa II que interviene posee un dominio carboxilo-terminal (CTD) rico en repeticiones de aminoácidos tirosina, serina, prolina y treonina. La fosforilación de estas serinas y treoninas actúa como un interruptor molecular que marca la transición de la fase de inicio a la de elongación. Este proceso es autoiniciador; generalmente, un ATP se aparea con el nucleótido +1 conservando sus tres grupos fosfato. Tras la adición de aproximadamente 10 nucleótidos y la fosforilación del CTD, la enzima se libera de los factores de inicio.

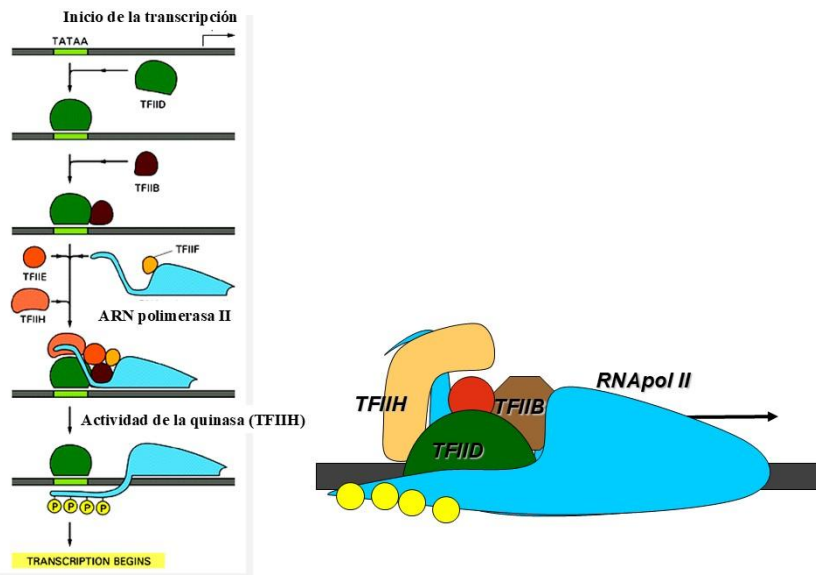


Figura 4.4. a) Primera etapa de la transcripción: iniciación. b) ARN polimerasa II y factores de transcripción. Tomado de Alberts *et al.* (2004).

Segunda etapa de la transcripción: elongación y maduración

La elongación y la maduración son etapas que ocurren de manera coordinada y simultánea. Durante esta fase, la ARN polimerasa se desplaza a lo largo de la hebra molde, catalizando la polimerización del transcrito primario. En eucariotas, de forma concomitante con la elongación, se inician los procesos de maduración postranscripcional (**Figura 4.5**).

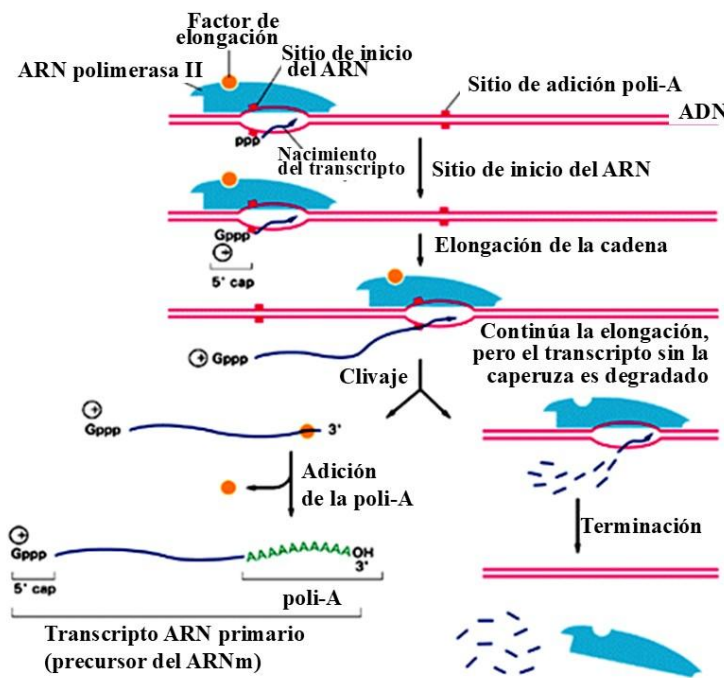


Figura 4.5. Etapas de la transcripción. Tomado de Alberts *et al.* (2004), con modificaciones.

La maduración del extremo 5' o adición de la caperuza (cap) ocurre tan pronto como el extremo 5' del transcrito emerge de la polimerasa; se inicia su procesamiento para protección y

reconocimiento (**Figura 4.6**). Una fosfatasa elimina el fosfato γ del primer nucleótido. Luego, una guanililtransferasa añade un GPT mediante un enlace 5'-5' trifosfato inusual. La metilasa metila la posición 7 de la guanina (m7G) y los grupos 2'-OH de las dos primeras ribosas del ARN. Esta caperuza protege al ARNm de la degradación por exonucleasas, facilita el transporte nuclear y es esencial para que el ribosoma reconozca el inicio de la traducción.

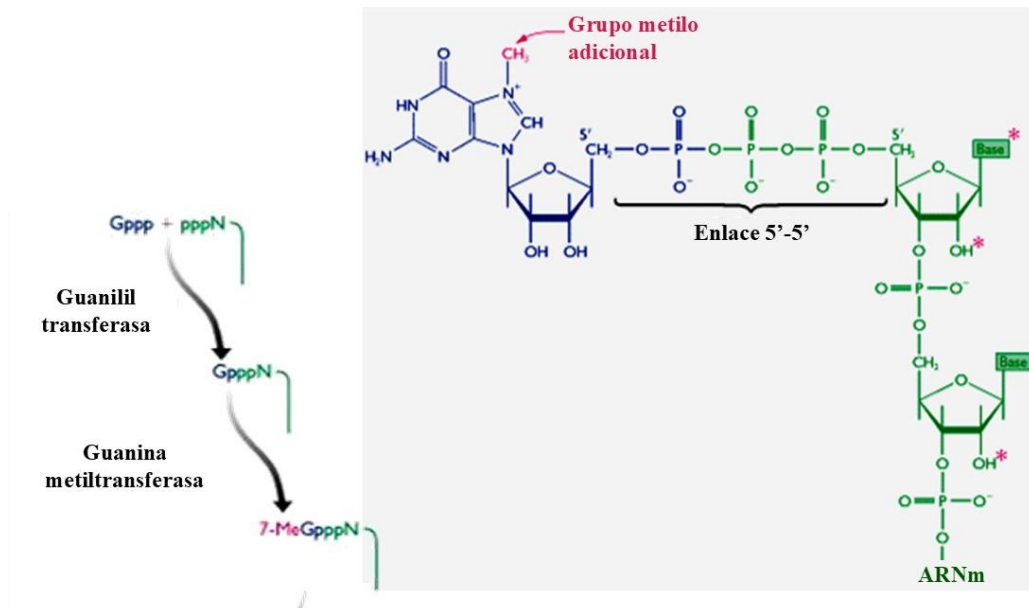


Figura 4.6. Maduración del extremo 5' del transcrito primario. Tomado de Alberts *et al.* (2004), con modificaciones.

El *splicing* o ajuste o corte y empalme es el procesamiento del mensaje que implica la remoción de secuencias no codificantes (intrones) y la unión de las codificantes (exones) (**Figura 4.7**). Este mecanismo químico se basa en dos reacciones consecutivas de transesterificación.

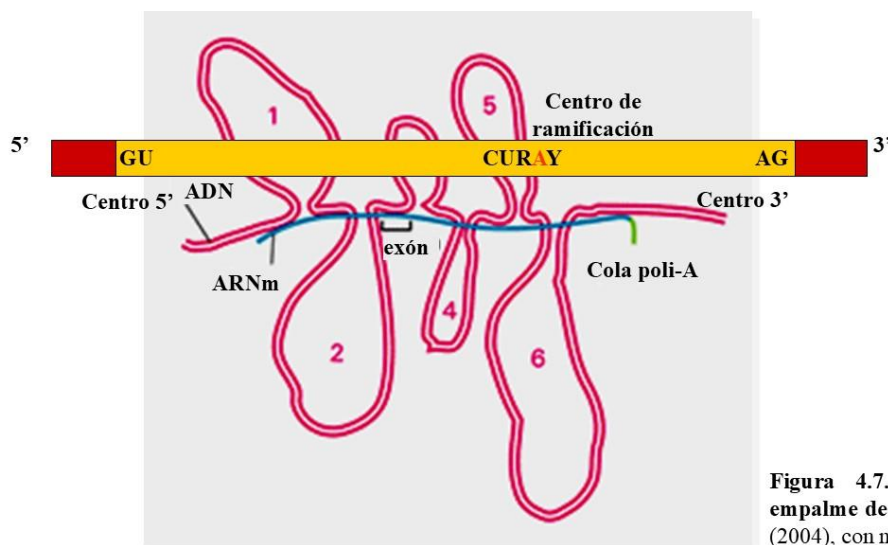


Figura 4.7. Eliminación de intrones y empalme de exones. Tomado de Alberts *et al.* (2004), con modificaciones.

Un residuo de adenina en el punto de ramificación realiza un ataque nucleofílico sobre el extremo 5' del intrón, formando una estructura de lazo (*lariat*). Posteriormente, el extremo 3'-OH del exón 1 ataca al extremo 5' del exón 2, ligándolos y liberando el intrón (**Figura 4.8**).

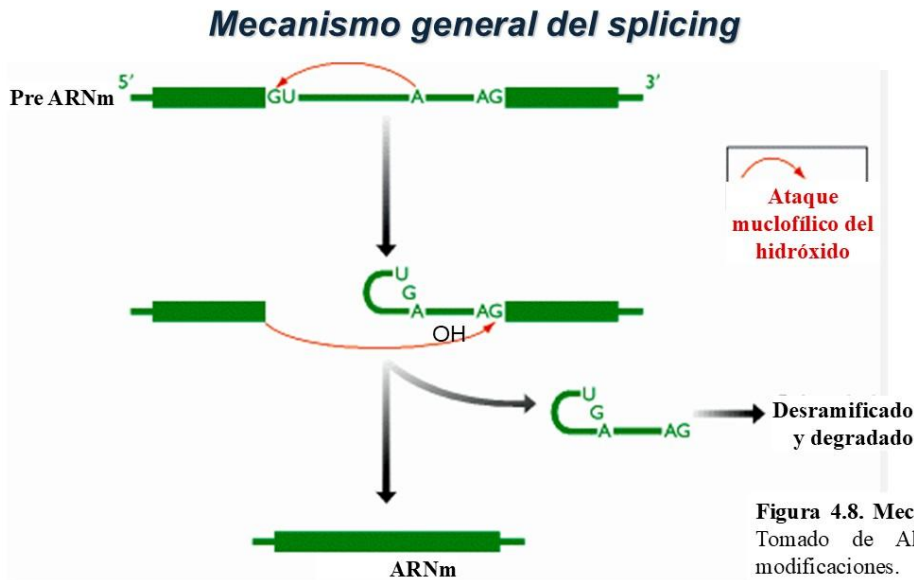


Figura 4.8. Mecanismo general del *splicing*.
Tomado de Alberts *et al.* (2004), con modificaciones.

Este proceso es catalizado por un complejo de ribonucleoproteínas nucleares pequeñas (snRNP) llamado spliceosoma. Estas reconocen las secuencias de consenso y coordinan los ataques nucleófilos. Existe una variante regulada de este mecanismo que permite aumentar drásticamente la diversidad de proteínas sin necesidad de un mayor número de genes. Esta variante se denomina *splicing alternativo*, en este un mismo gen puede dar lugar a diferentes proteínas mediante la inclusión o exclusión selectiva de ciertos exones, aumentando la diversidad proteica.

La poliadenilación es el proceso de maduración del extremo 3' del ARN mensajero (ARNm). Primero, el transcrito es cortado por endonucleasas después del reconocimiento de una secuencia señal, generalmente entre 10 y 30 nucleótidos corriente abajo de esta región. Luego, la enzima poli(A) polimerasa agrega al extremo 3' una cola de aproximadamente 200 adeninas, sin utilizar un molde de ADN.

La cola poli(A) se asocia con proteínas específicas que protegen al ARNm y aumentan su estabilidad. Con el tiempo, durante la traducción en el citoplasma, esta cola se acorta progresivamente por acción de exonucleasas, lo que finalmente conduce a la degradación del ARN mensajero.

Tercera etapa de la transcripción: terminación

La terminación de la transcripción es el proceso mediante el cual la ARN polimerasa deja de sintetizar ARN y se disocia del ADN, liberando el transcrito. Los mecanismos de terminación presentan diferencias importantes entre procariotas y eucariotas.

En procariotas, la terminación ocurre principalmente por dos mecanismos. En la terminación ρ -dependiente, la proteína Rho se une al ARN y avanza hasta alcanzar la ARN polimerasa, provocando la liberación del transcrito. En la terminación ρ -independiente (o intrínseca), la secuencia del ARN permite la formación de una estructura de horquilla seguida de una región rica en uracilos, lo que desestabiliza el complejo de transcripción y provoca su liberación.

En eucariotas, como se mencionó previamente, el transcrito primario contiene una secuencia señal de clivaje y poliadenilación que es reconocida por un complejo de proteínas. En esa región se produce el corte del ARN, generando el extremo 3' del ARN mensajero. Luego de este clivaje, la ARN polimerasa continúa transcribiendo por un corto tramo adicional antes de disociarse del ADN, liberando finalmente el transcrito sintetizado.

Transporte al citoplasma

El ARNm maduro eucariota, ya procesado con la caperuza 5', sin intrones y con cola poli-A, se asocia con diversas proteínas de unión al ARN que lo mantienen en una conformación adecuada y forman complejos ribonucleoproteicos. Estos complejos facilitan su transporte a través de los poros nucleares hacia el citosol. Una vez en el citoplasma, las proteínas de transporte se disocian y regresan al núcleo, mientras que el ARNm queda disponible para la síntesis proteica.

En procariotas, este proceso no ocurre, ya que no existe un núcleo que separe el ADN del citoplasma. Por ello, el ARN mensajero recién sintetizado puede ser reconocido inmediatamente por los ribosomas, de modo que la traducción puede comenzar incluso mientras la transcripción aún está en curso.

CONTROL DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

Tradicionalmente, la expresión génica se ha definido como el proceso mediante el cual la información codificada en un gen es decodificada para la síntesis de una proteína específica. No obstante, una definición biológicamente completa debe incluir a todos los productos génicos funcionales, lo que abarca tanto a las proteínas (vía ARNm) como a los diversos tipos de ARN

no codificantes, tales como el ARN ribosómico (ARNr), el ARN de transferencia (ARNt) y los ARN nucleares pequeños (ARNsn).

Uno de los fenómenos más complejos de la biología es la diferenciación celular en organismos multicelulares. A pesar de que todas las células somáticas de un individuo (derivadas del cigoto) poseen un genoma idéntico, son capaces de especializarse en tipos celulares morfológica y funcionalmente distintos, como neuronas o miocitos.

La identidad celular se establece mediante la activación selectiva y el silenciamiento de grupos específicos de genes en respuesta a señales de desarrollo y condiciones externas. El organismo humano comprende aproximadamente 200 tipos celulares distintos, cada uno con un repertorio de 10.000 a 20.000 proteínas diferentes. Se estima que el 22 % de los genes humanos está dedicado exclusivamente a controlar la expresión génica. Esta inversión genómica se justifica por la necesidad de una regulación precisa; cualquier desregulación en estos procesos puede derivar en patologías graves o en la inviabilidad del organismo. La composición proteica de una célula es dinámica y varía según la etapa del ciclo celular, el estadio del desarrollo embrionario y las demandas metabólicas del organismo en un momento dado.

CONTROL DE LA EXPRESIÓN GÉNICA EN PROCARIOTAS

Las estrategias de control génico son diferentes según los reinos biológicos. El modelo procariota se basa en la eficiencia y adaptabilidad. En organismos como *E. coli*, el control de la expresión génica es notablemente más sencillo debido a la ausencia de compartimentación nuclear. Al no existir una membrana nuclear, la traducción de las proteínas puede iniciarse de manera simultánea a la transcripción del ARNm. La regulación ocurre predominantemente a nivel de la transcripción. Las bacterias han desarrollado mecanismos sumamente eficientes para ajustar su síntesis proteica a los cambios ambientales, optimizando así el crecimiento y la división celular. Por ejemplo, *E. coli* posee la capacidad de sintetizar 1.700 proteínas diferentes, pero solo produce aquellas estrictamente necesarias según la disponibilidad de nutrientes. Ejemplos de regulación metabólica son la inducción por sustrato (lactosa) y la represión por producto (triptófano).

Regulación de la expresión génica por inducción por sustrato

En el primer caso, en presencia de lactosa, la bacteria induce la producción masiva de la enzima beta-galactosidasa (aproximadamente 3.000 moléculas), mientras que, en su ausencia, la síntesis se reduce a niveles basales mínimos. Este es un ejemplo del modelo del operón, descrito originalmente por Jacob y Monod, el cual explica que el control de la expresión génica

se articula a través de unidades funcionales denominadas operones. Un operón permite la regulación coordinada de genes que participan en una misma ruta metabólica. Sus componentes fundamentales incluyen genes estructurales (GE) que codifican para enzimas relacionadas; en el operón *lac*, estos son *lacZ* (beta-galactosidasa), *lacY* (permeasa) y *lacA* (transacetilasa); un promotor (P), sitio de reconocimiento para la ARN polimerasa; un operador, secuencia reguladora situada entre el promotor y los GE; un gen regulador, localizado fuera del operón que codifica una proteína represora que posee afinidad por el operador; y un efector, molécula pequeña que modula la actividad del represor por cambios conformacionales (**Figura 4.9**).

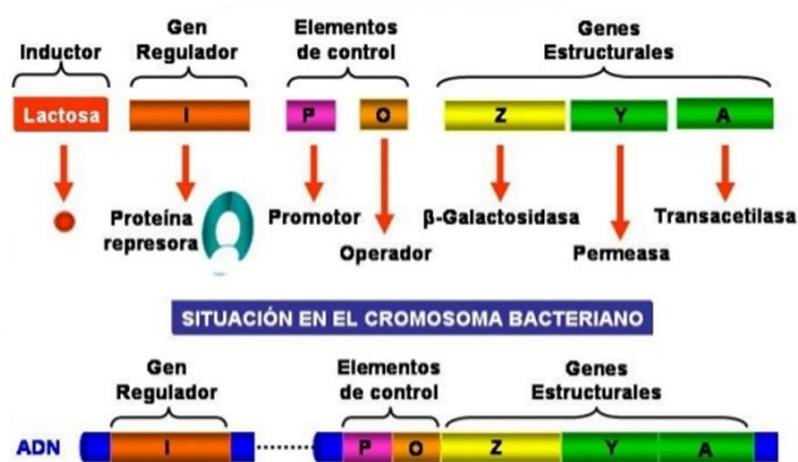


Figura 4.9. Operón lactosa. Operón inducible.

El operón *lac* es un sistema inducible donde la presencia del sustrato activa la transcripción de los genes necesarios para su catabolismo. En ausencia de lactosa, la proteína represora se une al operador, bloquea el avance de la ARN polimerasa e impide la transcripción. Cuando la lactosa ingresa a la célula, se convierte parcialmente en alolactosa. Esta molécula actúa como el verdadero inductor, se une al represor y provoca un cambio conformacional que lo libera del operador. Una vez liberado el operador, se expresan la permeasa (que facilita el ingreso de lactosa) y la beta-galactosidasa (que hidroliza el disacárido en glucosa y galactosa).

La bacteria exhibe una preferencia metabólica por la glucosa sobre la lactosa. Para optimizar el uso de energía, existe un mecanismo de control positivo mediado por la proteína activadora de catabolitos (CAP) y el segundo mensajero AMP cíclico (AMPc). Cuando la concentración de glucosa disminuye, se activa la enzima adenilato ciclasa, incrementando los niveles intracelulares de AMPc. El AMPc se une a la proteína CAP, permitiendo que esta adquiera una conformación activa capaz de unirse al ADN. El complejo CAP-AMPc se une a

una secuencia específica corriente arriba del promotor, facilitando el reclutamiento de la ARN polimerasa y aumentando drásticamente la tasa de transcripción.

Para que exista una expresión máxima del operón *lac*, deben cumplirse dos condiciones simultáneas: presencia de lactosa para liberar el represor del operador (control negativo) y ausencia de glucosa para permitir que el complejo CAP-AMPC potencie la unión de la polimerasa (control positivo).

Regulación de la expresión génica por represión por producto

En los organismos procariotas, la expresión génica está regida por principios de eficiencia metabólica, donde la célula ajusta su síntesis proteica para evitar el gasto innecesario de recursos energéticos (**Figura 4.10**). Cuando en el medio hay triptófano, este último actúa como un mecanismo de represión, inhibiendo la transcripción de los genes encargados de su síntesis *de novo*. Al unirse a la proteína represora, induce un cambio conformacional que la activa, permitiendo su unión al operador. Esta interacción bloquea físicamente el acceso de la ARN polimerasa, silenciando la expresión del operón (**Figura 4.10a**). En este contexto, el triptófano funciona como un correpresor que evita el gasto energético innecesario cuando el aminoácido ya está disponible externamente.

A diferencia del operón *lac*, el operón del triptófano (*trp*) funciona como un sistema de retroalimentación negativa basado en la demanda del producto final. Cuando los niveles intracelulares de triptófano son bajos, la proteína represora permanece en una configuración inactiva (**Figura 4.10b**). En este estado, el represor no posee afinidad por el operador, permitiendo que la ARN polimerasa se una al promotor y transcriba los genes estructurales encargados de la síntesis *de novo* del aminoácido.

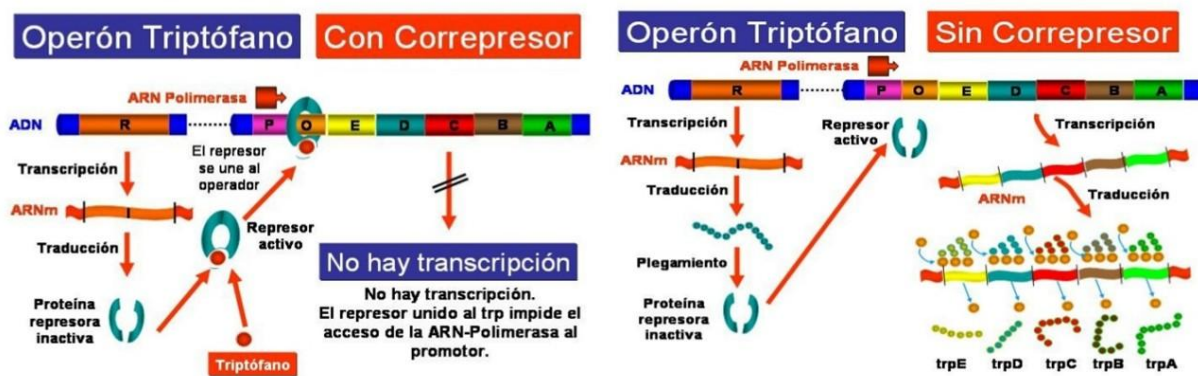


Figura 4.10. Operón triptófano. Operón represible y represor inactivo.

La regulación génica en bacterias se clasifica en cuatro modalidades fundamentales, dependiendo de la naturaleza de la proteína reguladora y el efecto del ligando (efector) (**Figura 4.11**).

- Regulación negativa: en estos sistemas, el determinante del estado génico es una proteína represora que, al estar unida al ADN, impide la transcripción:
 1. Inducción negativa: el represor está intrínsecamente activo y bloquea el gen; la unión de un ligando (inductor) lo inactiva, permitiendo la transcripción (**Figura 4.11a**).
 2. Represión negativa: el represor es inactivo por sí solo; requiere la unión de un ligando (corepresor, como el triptófano) para activarse y bloquear el gen (**Figura 4.11b**).
- Regulación positiva: una proteína activadora debe unirse al ADN para facilitar el reclutamiento de la ARN polimerasa y potenciar la transcripción:
 3. Represión positiva: la proteína activadora se une constitutivamente al ADN, manteniendo el gen encendido; la presencia de un ligando provoca su liberación, resultando en el apagado de la transcripción (**Figura 4.11c**).
 4. Inducción positiva: la proteína activadora requiere la unión de un ligando para adquirir la conformación necesaria para unirse al ADN e iniciar el proceso (**Figura 4.11d**).

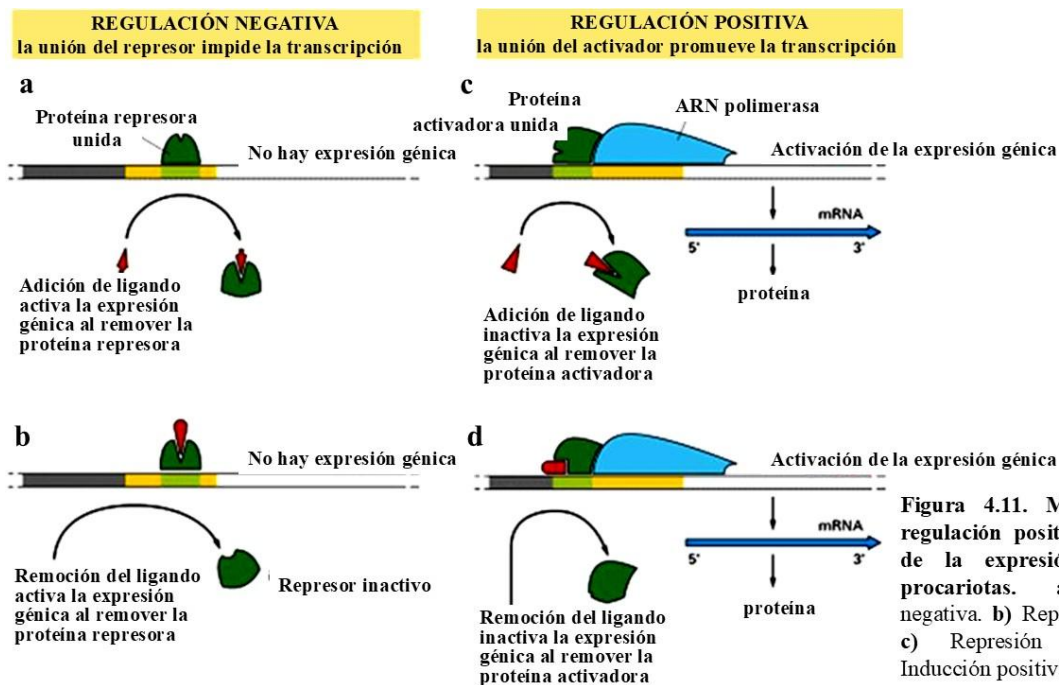


Figura 4.11. Mecanismos de regulación positiva y negativa de la expresión génica en procariotas. a) Inducción negativa. b) Represión negativa. c) Represión positiva. d) Inducción positiva.

Esta versatilidad de mecanismos permite a los procariotas comportarse como sistemas biológicos altamente optimizados, capaces de responder de forma inmediata a las fluctuaciones

ambientales mediante el acoplamiento directo entre la disponibilidad de sustratos y la actividad del aparato transcripcional.

CONTROL DE LA EXPRESIÓN GÉNICA EN EUCARIOTAS

Puntos de control durante el flujo de la información génica

Mientras que en procariontes el propósito del control génico es la respuesta rápida y eficiente a las fluctuaciones ambientales, en eucariotas multicelulares el objetivo primordial es la ejecución coordinada del programa genético que subyace al desarrollo embrológico y la especialización de tejidos. La expresión génica en eucariotas es un proceso altamente compartimentado y regulado en múltiples niveles. La alteración de cualquiera de estos pasos es un factor crítico en la etiología de patologías complejas, como el cáncer. En la **Figura 4.12** se observan de manera global los puntos de control génico en eucariotas.

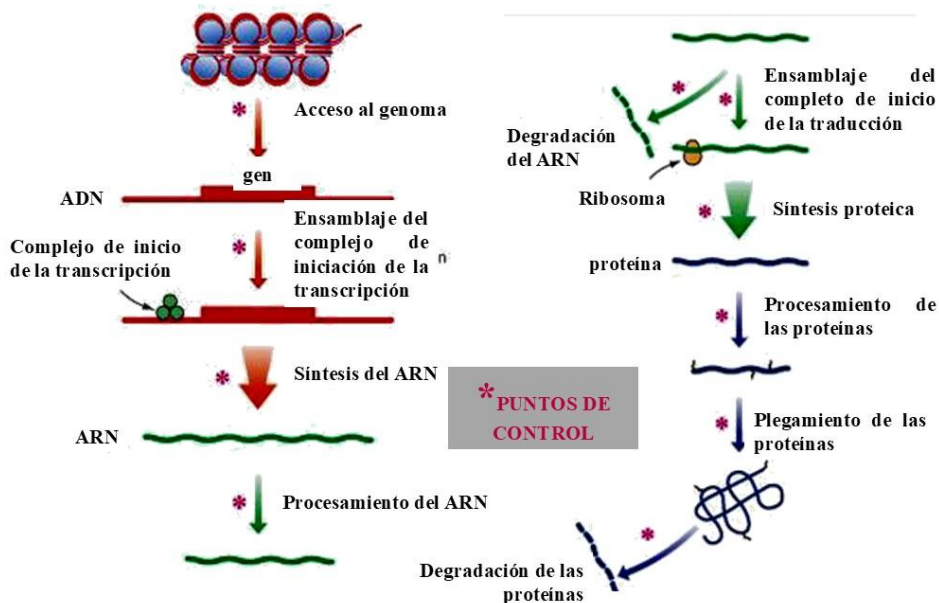


Figura 4.12. Visión global de los puntos de control de la regulación génica en eucariotas.

El primer punto de control es el acceso de las proteínas involucradas en la transcripción al ADN. Una vez librado este control, inicia la transcripción y el procesamiento del ARN, procesos también regulados. Algunos ARN se degradan dependiendo de su vida media; otros ARN sirven de plantilla para la traducción, proceso regulado. El procesamiento, el plegamiento, la degradación y la vida media de las proteínas también se encuentran regulados.

A continuación, se estudiará la expresión génica a nivel pre-transcripcional (accesibilidad al ADN para la transcripción); transcripcional (frecuencia y velocidad de inicio, elongación y eficacia de terminación de la transcripción); y los motivos estructurales de unión al ADN.

CONTROL DE LA EXPRESIÓN GÉNICA PRETRANSCRIPCIONAL

Este nivel regula la capacidad física de la maquinaria de transcripción para acceder a las secuencias de ADN. Los procesos involucrados en este nivel de control son la condensación de la cromatina y la metilación del ADN.

Como se estudió en el capítulo 3, el ADN se organiza alrededor de octámeros de histonas formando nucleosomas. Para permitir la lectura del ADN, las histonas acetiltransferasas (HAT) acetilan residuos de lisina en las histonas, eliminando su carga positiva y reduciendo su afinidad por el ADN (polianiónico). Este proceso desensambla la fibra de cromatina, permitiendo el acceso a los factores de transcripción. Posteriormente, las histonas desacetilasas (HDAC) revierten este proceso para reconstituir el nucleosoma.

Con respecto a la metilación del ADN, esta es una modificación epigenética que ocurre principalmente en los promotores. La presencia de grupos metilo impide físicamente la unión de factores de transcripción, silenciando el gen. Por el contrario, los promotores no metilados permiten el ensamblaje del complejo de iniciación.

CONTROL DE LA EXPRESIÓN GÉNICA TRANSCRIPCIONAL

Aunque existen múltiples puntos de control, la regulación principal ocurre a nivel transcripcional, controlando la frecuencia y velocidad de inicio de la síntesis. Los factores involucrados son los factores *cis*, secuencias promotoras y los factores *trans* o factores proteicos (sus genes codificadores están situados en otra parte y dan origen a proteínas que van a interactuar con los promotores para poder regular la transcripción).

Control de la expresión génica transcripcional: elementos *cis*

Los elementos *cis* son promotores, son secuencias consenso que se encuentran en el ADN que regulan el gen. Una secuencia consenso es una secuencia que se forma del análisis de muchas secuencias; cada posición de la secuencia está ocupada por la base más frecuente. Las secuencias promotoras en algunos genes pueden tener una determinada secuencia y en otros genes, pueden variar en alguna base. La secuencia consenso más conocida es la del promotor basal, la secuencia TATA (**Figura 4.13**).

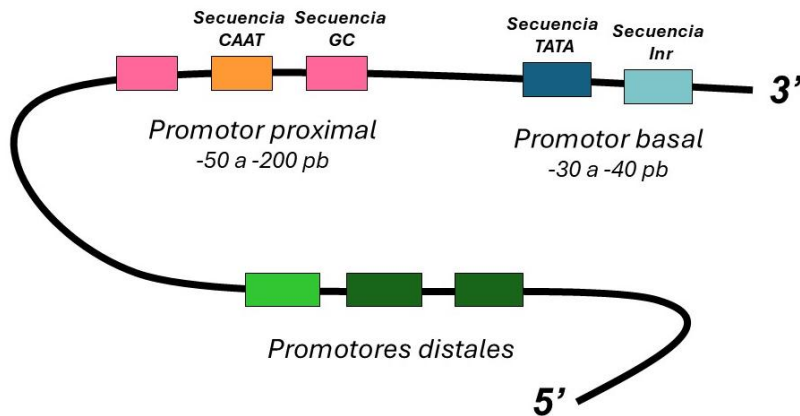


Figura 4.14. Regulación génica transcripcional. Elementos *cis*. Promotor basal, proximal y promotores distales.

Tabla 4.2. ARN polimerasas involucradas en la transcripción.

| Polimerasa | Promotores que reconoce | Gen que transcribe | Producto génico | Promotores | Factor de transcripción |
|--------------------|-------------------------|--------------------|-----------------------------|--------------|-------------------------|
| ARN polimerasa I | Promotores tipo I | De clase I | ARNr 28S; 18S; 5,8S | De clase I | TFI |
| ARN polimerasa II | Promotores tipo II | De clase II | Proteínas y ARNsn | De clase II | TFII |
| ARN polimerasa III | Promotores tipo III | De clase III | ARNt; ARNr 5S; ARN pequeños | De clase III | TFIII |

En la **Figura 4.15** se presenta el modelo general de los elementos de control que regulan la expresión génica en los eucariotas multicelulares y en levaduras. Los promotores distales pueden estar corriente arriba (miles o millones de pares de bases corriente arriba), pueden estar corriente abajo o incluso dentro de la región estructural.

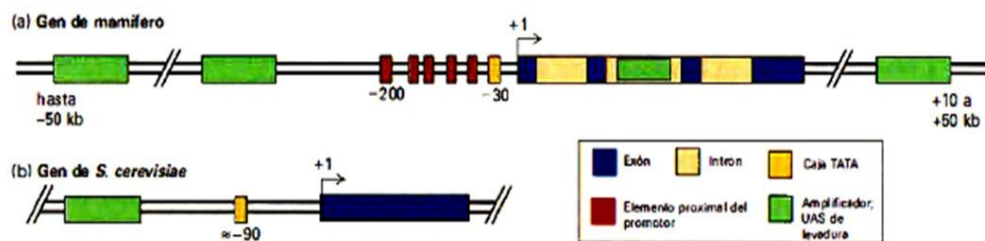


Figura 4.15. Regulación génica transcripcional. Modelo general de los elementos *cis* en eucariotas multicelulares (a) y en levaduras (b).

Control de la expresión génica transcripcional: elementos *trans*

Los factores *trans* son factores de transcripción (TF), son proteínas codificadas por genes distantes que reconocen secuencias, a menudo palindrómicas, en el ADN. Una secuencia palindrómica es aquella misma secuencia que puede leerse de 5' → 3' en ambas hebras. Por ejemplo, la secuencia GAATTC se lee en sentido 5' → 3' en una de las hebras; su complementaria (en la otra hebra) es CTTAAG, en sentido 3' → 5'. Los factores de transcripción suelen presentar distintos dominios funcionales. Entre ellos se encuentran: dominios de unión al ADN, responsables del reconocimiento de secuencias específicas; dominios de activación, que interactúan con otras proteínas para estimular la transcripción desde un promotor cercano; y, en algunos casos, dominios de represión, que inhiben la transcripción al impedir la acción de otros factores de transcripción o al reclutar complejos represores. Los TF se clasifican según los promotores a los cuales se unen:

- Los TF generales se unen a la secuencia del promotor basal.
- Los TF proximales se unen a la secuencia del promotor proximal.
- Los TF inducibles se unen a las secuencias de promotores distales.

Motivos estructurales responsables de la interacción con el ADN

Los TF "leen" el ADN, generalmente a través del surco mayor, mediante interacciones no covalentes sumamente específicas (**Figura 4.16**). Los motivos estructurales de los factores de transcripción son regiones o plegamientos específicos de la proteína que permiten reconocer y unirse a secuencias particulares de ADN. Estos motivos forman estructuras tridimensionales que encajan en el surco mayor del ADN, donde establecen interacciones específicas con las bases nitrogenadas, lo que les permite reconocer secuencias reguladoras concretas. Por lo cual, estos motivos estructurales se encuentran dentro de los TF.

En la **Figura 4.17** se detallan los principales motivos estructurales mediante los cuales los TF reconocen la secuencia del ADN.

- Motivo hélice-giro-hélice (HTH): dos hélices alfa separadas por una corta secuencia de aminoácidos; la hélice de reconocimiento se inserta en el surco mayor (**Figura 4.17a**). Se encuentra en la proteína CAP, que actúa en la regulación del operón lactosa.
- Motivo homeodominio: tiene 3 hélices alfa y además tiene un péptido lineal, que interactúa con el surco menor (**Figura 4.17b**). Se encuentra en proteínas que regulan el desarrollo embrionario.

- Motivo hélice-bucle-hélice (HLH): parecido al motivo HTH, pero con un bucle más largo que permite mayor flexibilidad al TF (**Figura 4.17c**).
- Motivo cremallera de leucina: dímeros con residuos de leucina orientados hacia el interior, formando una interfaz hidrofóbica estable (**Figura 4.17d**).

Motivo dedo de zinc: residuos de cisteína e histidina que coordinan un átomo de zinc, formando una estructura protruida que interactúa con el ADN (**Figura 4.17e**).

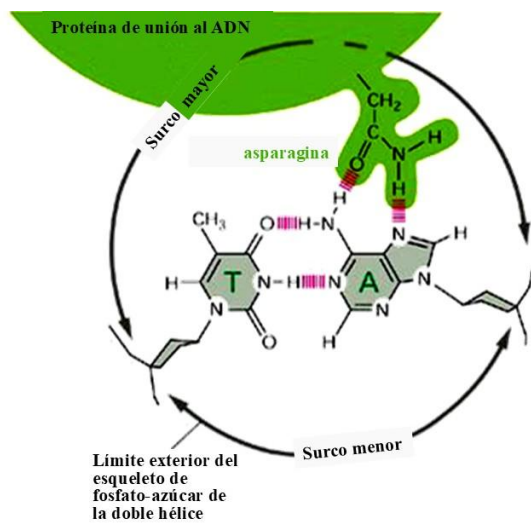


Figura 4.16. Motivo de unión del TF que le permite “leer” y reconocer la secuencia del ADN en el surco mayor.

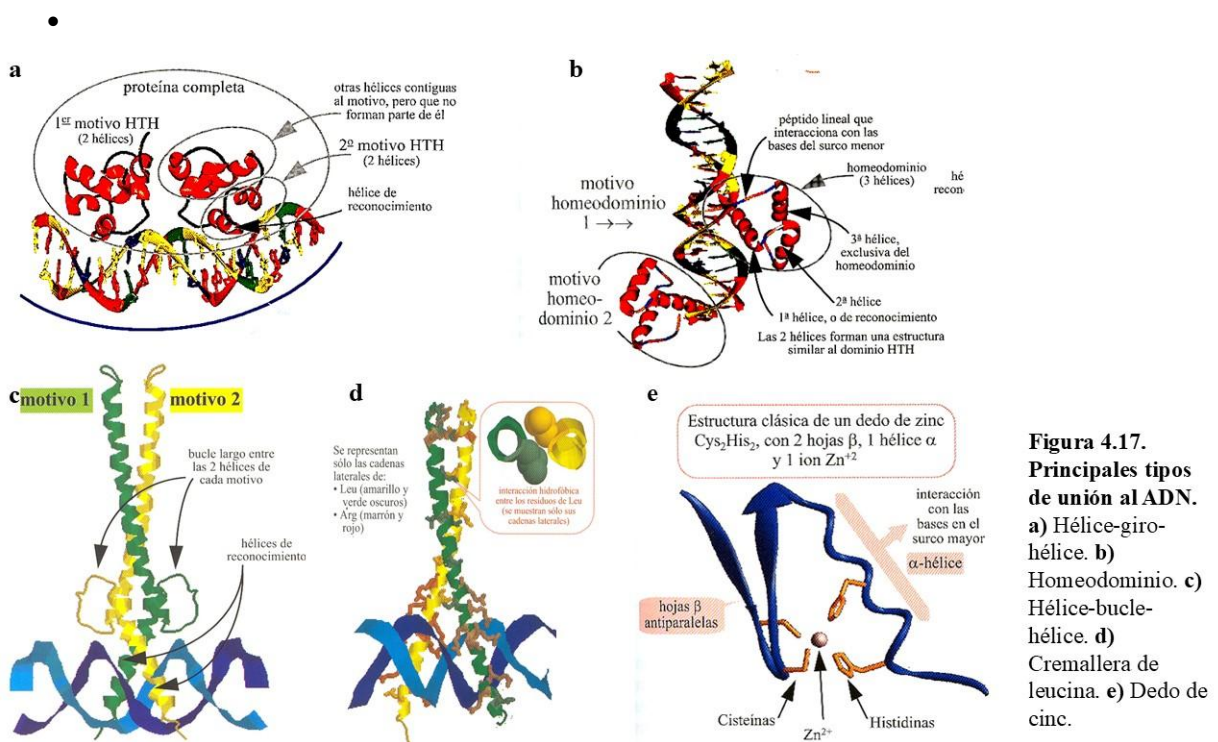


Figura 4.17. Principales tipos de unión al ADN. **a)** Hélice-giro-hélice. **b)** Homeodominio. **c)** Hélice-bucle-hélice. **d)** Cremallera de leucina. **e)** Dedo de cinc.

Mecanismo de acción de los factores de transcripción

Los TF pueden actuar de dos maneras, regulando el acceso a las secuencias de inicio y colaborando con la estabilidad del complejo de inicio.

Los TF regulan el acceso a las secuencias de inicio mediante la hiperacetilación y la desacetilación de las histonas. Cuando las histonas están desacetiladas tienen carga positiva, por lo tanto, están unidas al ADN y no puede ocurrir la transcripción. Sin embargo, cuando hay una hiperacetilación de las histonas, estas pierden sus cargas positivas, pierden su afinidad por el ADN. Este se desensambla y puede transcribirse (**Figura 4.18**).

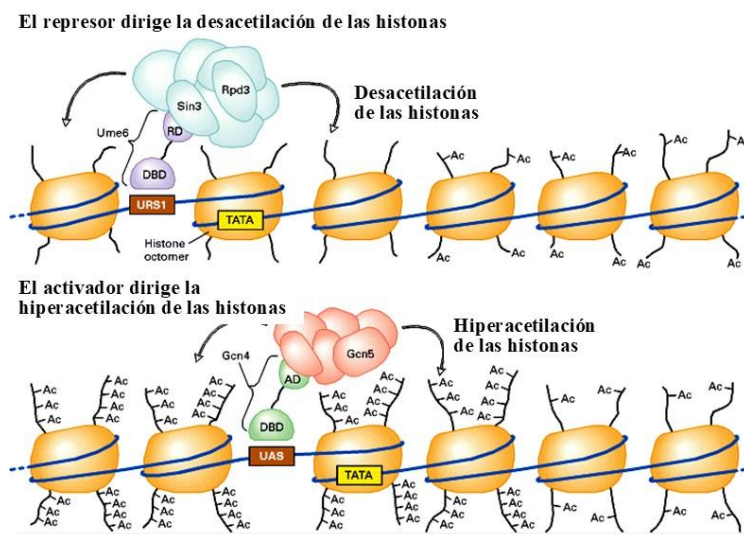


Figura 4.18. Mecanismo de acción de los TF. Regulan el acceso a las secuencias de inicio mediante la desacetilación y la hiperacetilación de las histonas.

En la **Figura 4.19** se observa el mecanismo de los TF en el que estabilizan el complejo de inicio. Los TF se unen al ADN; estos tienen dominio de unión al ADN y dominio de activación. La molécula de ADN se tuerce y las proteínas pueden interactuar, favoreciendo la unión de la polimerasa para que esta inicie la transcripción.

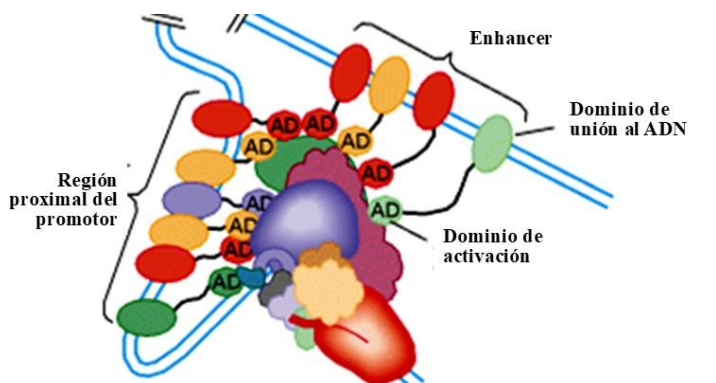


Figura 4.19. Mecanismo de acción de los TF. Regulan la estabilidad del complejo de inicio de la transcripción.

Análisis comparativo entre los genes de expresión basal y regulada

La capacidad de una célula para gestionar su repertorio proteico se divide en dos grandes estrategias operativas, fundamentales para mantener la homeostasis y permitir la diferenciación funcional. Los genes de expresión basal y los genes de expresión regulada (**Figura 4.20**).

Los genes de expresión basal, frecuentemente denominados genes constitutivos, genes de mantenimiento (*housekeeping genes*), se caracterizan por una expresión constante e ininterrumpida durante todo el ciclo de vida celular. Estos codifican productos génicos esenciales para procesos metabólicos básicos y estructurales que la célula requiere de forma permanente. Aunque su expresión es continua, la velocidad de síntesis está predeterminada por la afinidad intrínseca de su promotor basal con la ARN polimerasa. Un gen constitutivo puede sintetizarse a una tasa elevada si su producto es requerido en grandes cantidades, o a una tasa mínima si solo se necesitan trazas, pero manteniendo siempre un flujo de producción estable.

La expresión de los genes de expresión regulada es facultativa y depende estrictamente de estímulos intracelulares o señales extracelulares. Este mecanismo permite a la célula economizar recursos y responder a cambios ambientales o programas de desarrollo. La modulación de estos genes ocurre principalmente mediante la interacción de proteínas reguladoras con los promotores o silenciadores (secuencias de ADN específicas situadas a distancia del sitio de inicio). Cuando los TF activadores reconocen los potenciadores o *enhancers*, estos incrementan significativamente la tasa de transcripción por encima del nivel basal. Los silenciadores o *silencers* actúan de manera antagónica, inhibiendo o bloqueando la expresión del gen cuando se les unen proteínas represoras.

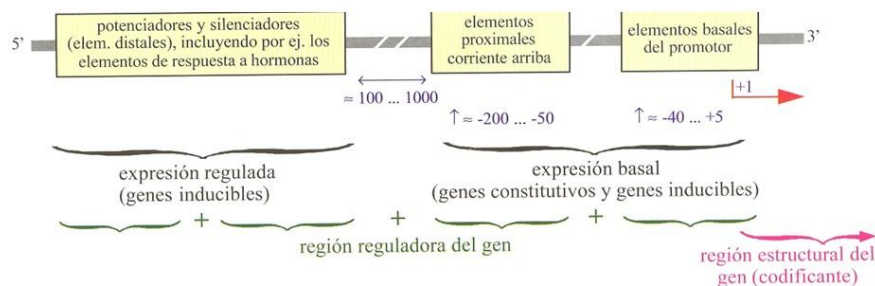


Figura 4.20. Genes de expresión basal y regulada.

Mientras que la expresión basal garantiza la infraestructura vital de la célula, la expresión regulada confiere la plasticidad necesaria para la especialización tisular y la adaptación fisiológica. Así, los genes de expresión basal tienen promotores basales y proximales y se expresan a velocidad constante; mientras que los genes de expresión regulada, además de

contener los promotores basales y proximales, tienen los promotores distales que pueden ser potenciadores o silenciadores.

Factores de transcripción inducibles

Los factores de transcripción (TF) inducibles median la transición entre estados inactivos y activos de genes cuya expresión está regulada. A diferencia de los factores constitutivos, los TF inducibles no son funcionales de manera permanente, sino que requieren una señal de activación previa, como la unión de una hormona, una fosforilación mediada por quinasas o cambios en el estado redox celular. Una vez activados, estos factores pueden translocarse al núcleo o interactuar con sus elementos reguladores específicos en el ADN, modulando así el perfil de expresión génica de la célula.

Los TF inducibles pueden activarse por diferentes mecanismos, entre ellos:

- **Biosíntesis de la proteína:** la regulación ocurre a nivel de la síntesis del propio factor de transcripción; una vez producido, este puede ejercer su función reguladora.
- **Unión a un ligando:** la interacción con una molécula señal (por ejemplo, hormonas o metabolitos) induce un cambio conformacional que activa al TF.
- **Fosforilación:** la modificación postraduccional por quinasas puede activar o aumentar la capacidad del factor para unirse al ADN o interactuar con otros componentes de la maquinaria transcripcional.
- **Formación de complejos con otras proteínas:** algunos TF requieren asociarse con cofactores o formar heterodímeros para adquirir actividad reguladora.
- **Desenmascaramiento:** en ciertos casos el dominio funcional del TF se encuentra oculto por una región inhibidora o por interacción con otra proteína, y la señal celular provoca su liberación o exposición.
- **Traslado al núcleo:** algunos TF permanecen inicialmente en el citoplasma y, tras recibir la señal apropiada, se translocan al núcleo donde pueden unirse al ADN y regular la transcripción.

La transición entre un estado inactivo y uno activo (o viceversa) de los genes de expresión regulada está mediada por los TF inducibles. Los TF inducibles son proteínas no constitutivamente funcionales. Estos requieren una activación previa provocada por una señal (como la unión de una hormona, una fosforilación por quinasas o un cambio en el estado redox). Una vez activados, estos TF se translocan al núcleo o se unen a sus elementos distales

correspondientes para reprogramar el perfil de expresión de la célula. Los TF inducibles pueden activarse de diferentes maneras.

Receptores de hormonas esteroideas

Estos receptores actúan directamente como TF inducibles por ligando. Pueden localizarse en la membrana plasmática, en el citosol o en el núcleo. Permiten que la célula genere una respuesta biológica eficiente ante el estímulo hormonal. Esta familia incluye receptores para estrógenos, progesterona, glucocorticoides, hormonas tiroideas y ácido retinoico. A pesar de su diversidad, estos receptores comparten una arquitectura molecular conservada, organizada en dominios funcionales específicos. Su dominio amino terminal, cuya región es variable, participa en la activación de la transcripción. Su dominio de unión al ADN altamente conservado permite el reconocimiento de secuencias genómicas. Su dominio de unión al ligando, en el carboxilo terminal, es el sitio de interacción con la hormona terminal e induce el cambio conformacional, se activa como TF y el complejo receptor-hormona se transloca al núcleo (si no se encuentra allí) para unirse a secuencias específicas del ADN denominadas elementos de respuesta (promotores).

Un ejemplo es el receptor de glucocorticoides (GR; Figura 4.21). En ausencia de la hormona, el receptor se encuentra en el citoplasma, formando un complejo con proteínas chaperonas (como la HSP90), que mantienen al receptor en una conformación de alta afinidad por el ligando, pero impiden su entrada al núcleo. Cuando la hormona esteroidea atraviesa la membrana plasmática y se une al dominio de unión al ligando (LBD) del receptor, induce un cambio conformacional crítico en la estructura proteica que provoca la disociación de las proteínas chaperonas. La liberación de estas proteínas deja expuesta una secuencia de localización nuclear (NLS). Esta señal es reconocida por el aparato de transporte celular, permitiendo la translocación activa del complejo receptor-hormona desde el citosol hacia el interior del núcleo a través de los poros nucleares. Una vez en el compartimento nuclear, el receptor se dimeriza (dos receptores se unen para ser funcionales en el ADN) y se une a secuencias específicas de ADN denominadas elementos de respuesta a glucocorticoides (GRE), ubicadas generalmente en las regiones promotoras de los genes diana (genes específicos que se activan en la respuesta biológica). La unión del factor de transcripción al promotor recluta la maquinaria coactivadora, que inicia la transcripción génica. En este contexto, el receptor promueve la expresión de genes con funciones específicas, destacando la activación de

programas genéticos responsables de la respuesta antiinflamatoria y la represión de mediadores proinflamatorios.

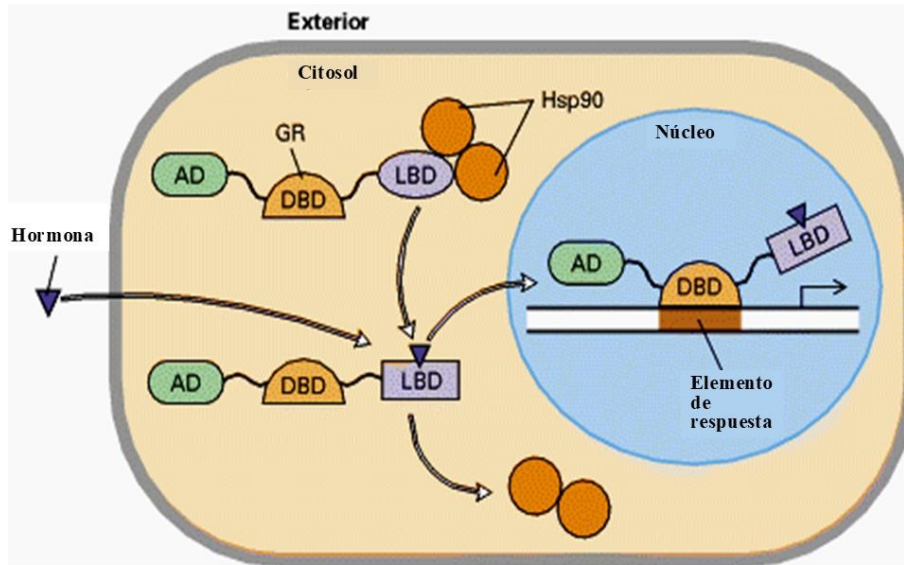


Figura 4.21. Mecanismo de acción de los TF inducibles. Ejemplo de un receptor de glucocorticoides. Tomado de Lodish *et al.* (2016), con modificaciones.

Receptor del interferón gamma

El interferón gamma (IFN- γ) es una citoquina crítica en la respuesta inmunitaria innata y adaptativa, cuya función principal es la activación de mecanismos celulares para la eliminación de patógenos. Su mecanismo de acción es un ejemplo paradigmático de la activación de factores de transcripción mediante fosforilación (adición de un grupo fosfato que actúa como "interruptor" molecular) (**Figura 4.22**). El receptor de IFN- γ es una proteína transmembrana compuesta por subunidades que, en ausencia de ligando, permanecen separadas en la membrana plasmática. Asociadas a sus dominios intracitoplasmáticos se encuentran las quinasas Janus (JAK), las cuales se mantienen en un estado inactivo mientras el receptor no esté ligado. Tras la unión del interferón al dominio extracelular, se induce la dimerización del receptor. Este cambio conformacional aproxima a las proteínas JAK, permitiendo su activación mediante fosforilación cruzada. Una vez activadas, las JAK fosforilan residuos específicos de tirosina en el dominio citoplasmático del receptor, creando sitios de acoplamiento para proteínas de señalización descendentes. Las proteínas transductores de señal y activadores de la transcripción (STAT) son reclutadas hacia el receptor fosforilado. Las quinasas JAK proceden a fosforilar las proteínas STAT. Esta modificación covalente induce la liberación de STAT del receptor y favorece su homodimerización, requisito indispensable para su funcionalidad, ya que la mayoría de los factores de transcripción operan como dímeros. El dímero de STAT activado

se transloca al núcleo celular, donde se une a secuencias específicas de ADN, a los elementos de respuesta. A través de su dominio de unión al ADN, el complejo inicia la transcripción de genes diana involucrados en la cascada inflamatoria.

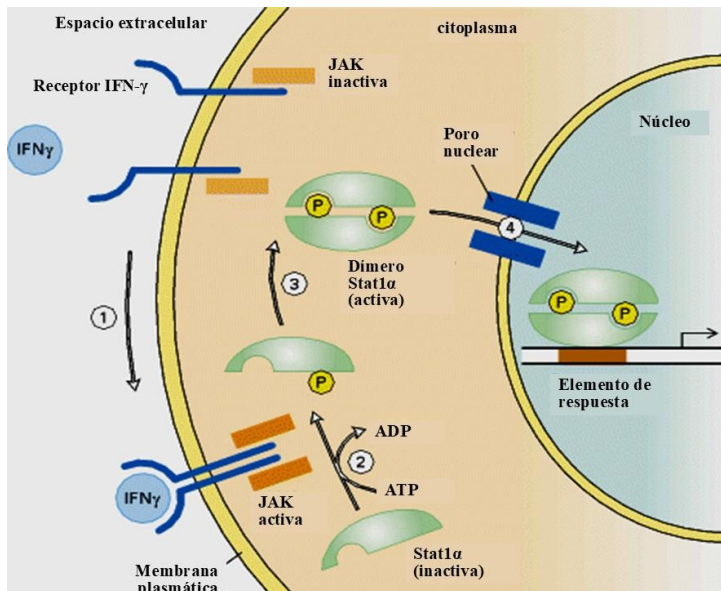


Figura 4.22. Mecanismo de acción de los TF inducibles. Ejemplo de un receptor del interferón gamma (IFN- γ). Tomado de Lodish *et al.* (2016), con modificaciones.

CONTROL DE LA EXPRESIÓN GÉNICA POSTRANSCRIPCIONAL

Maduración y procesamiento del pre-ARNm: características

La expresión génica no depende exclusivamente de la tasa de transcripción; tras la síntesis del pre-ARNm, la célula emplea una serie de mecanismos de control que determinan la estructura proteica final y la persistencia de la señal. Estos mecanismos tienen que ver con:

- El control del procesamiento del ARN, velocidad de procesamiento y maduración alternativa.
- Control de la degradación del ARN, estabilidad del ARN maduro.
- Control del transporte del ARN, selección de los ARN que serán transportados y transporte activo a través de los poros nucleares.

Control del procesamiento del ARN: *splicing* alternativo

El *splicing* o empalme alternativo permite generar múltiples isoformas proteicas (variantes proteicas producidas por un mismo gen) a partir de una única unidad de transcripción (**Figura 4.23**). Un ejemplo clásico es el gen de la troponina T (**Figura 4.23a**). Su isoforma α , presente en el músculo liso, resulta de la unión de los exones 1, 2, 3 y 5. Su isoforma β , presente en otros tejidos, resulta de la unión de los exones 1, 2, 4 y 5. Este proceso demuestra cómo la selección diferencial de exones permite que un solo gen codifique productos proteicos con funciones

especializadas según el contexto tisular. Otro ejemplo es el gen de la cadena pesada de la inmunoglobulina IgM. Según el *splicing* alternativo origina sus dos IgM: una IgM de membrana, formada por el empalme de todos los exones del gen; y la otra IgM de secreción, formada por el empalme de los exones 1, 2, 3 y 4 (**Figura 4.23b**).

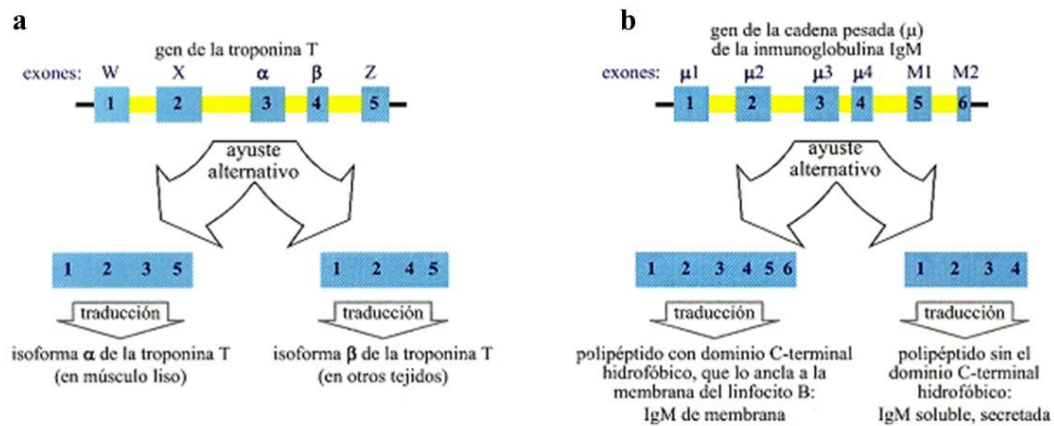


Figura 4.23. Regulación de la maduración del ARN. *Splicing* alternativo. a) Ejemplo del gen de la troponina T: isoforma α formada por el empalme o ajuste de los exones 1, 2, 3 y 5; isoforma β , formada por el empalme de los exones 1, 2, 4 y 5. b) Ejemplo de la IgM: IgM de membrana, formada por el empalme de todos los exones del gen; IgM de secreción, formada por el empalme de los exones 1, 2, 3 y 4. Tomado de Alberts *et al.* (2016).

Control del procesamiento del ARN: edición del ARN

La edición del ARN altera la secuencia nucleotídica después de la transcripción, modificando el mensaje genético original. El caso de la apoproteína B ilustra este fenómeno (**Figura 4.24**). En el hígado, el transcrito no se edita, manteniendo el codón CAA que permite la traducción de la proteína completa (Apo-B100), esencial para el transporte de VLDL y LDL. En el intestino delgado, una enzima desaminasa convierte la citosina en uracilo (UAA) y genera un codón de terminación prematuro. Esto produce la Apo-B48, una proteína truncada que es estructuralmente necesaria para la formación de los quilomicrones (lipoproteínas del epitelio intestinal que transportan triglicéridos exógenos) y el transporte de lípidos dietéticos.

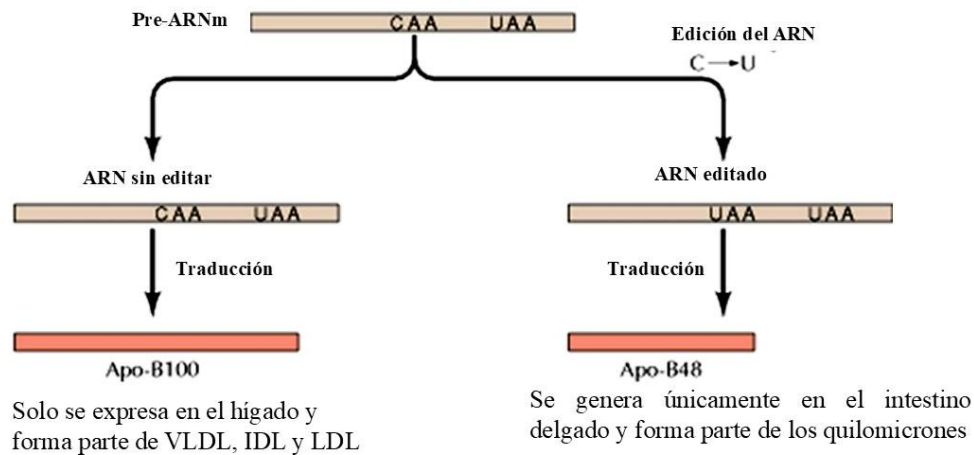


Figura 4.24. Regulación de la maduración del ARN. Edición. Ejemplo de la apoproteína B. Tomado de Lodish *et al.* (2016), con modificaciones.

Control de la estabilidad del ARN

La estabilidad del ARN mensajero (ARNm) constituye un mecanismo importante de regulación postranscripcional de la expresión génica. La vida media de un ARNm en el citosol determina cuánto tiempo estará disponible para ser traducido y, por lo tanto, cuántas moléculas de proteína podrán sintetizarse a partir de él. Esta estabilidad puede estar regulada por diversos mecanismos, entre ellos la longitud de la cola poli-A, la unión de proteínas reguladoras al ARNm y la presencia de secuencias regulatorias en regiones no traducidas, particularmente en el extremo 3'.

Un ejemplo es el elemento de respuesta al hierro (IRE, del inglés *Iron Response Element*), es una secuencia específica presente en algunos ARN mensajeros que codifican proteínas relacionadas con el metabolismo del hierro. Se localiza generalmente en las regiones no traducidas (UTR) del ARNm, ya sea en el extremo 5' o en el 3', y adopta una estructura característica de tallo-bucle. Esta estructura funciona como sitio de unión para proteínas reguladoras de hierro (IRP, del inglés *Iron Regulatory Proteins*), que permiten ajustar la expresión de estos genes según la disponibilidad de hierro en la célula.

El sistema IRE–IRP regula la traducción o la estabilidad del ARNm dependiendo de la posición del IRE y de la concentración de hierro celular. Cuando el hierro es bajo, las proteínas IRP se unen al IRE: si este se encuentra en la región 5' UTR, la unión bloquea la iniciación de la traducción; en cambio, si está en la región 3' UTR, la unión estabiliza el ARNm y evita su degradación. Cuando el hierro es abundante, las IRP no se unen al IRE, lo que permite la traducción en el primer caso o favorece la degradación del ARNm en el segundo. Este

mecanismo permite regular de manera fina la síntesis de proteínas involucradas en la captación, almacenamiento y utilización del hierro.

Respecto a los IRE, el receptor de transferrina utiliza un sistema de control de estabilidad mediado por proteínas de unión al ARN (**Figura 4.25**). Cuando hay suficiencia de hierro, la proteína reguladora no se une al extremo 3' del ARNm, dejando el sitio vulnerable a las nucleasas, lo que provoca una degradación rápida. Por el contrario, cuando escasea el hierro, la proteína reguladora se une al IRE, estabilizando el bucle del ARNm y bloqueando la acción de las nucleasas. Esto permite una traducción sostenida para incrementar los receptores de membrana y optimizar la captación de hierro.

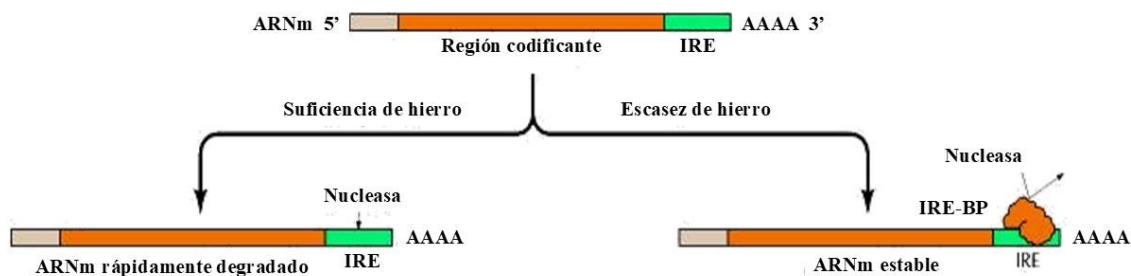


Figura 4.25. Regulación de la estabilidad del ARN. Ejemplo de la transferrina. Tomado de Lodish *et al.* (2016), con modificaciones.

Control del transporte del ARN

El transporte del ARN a través del complejo del poro nuclear (NPC) hacia el citosol es un proceso selectivo, estrictamente regulado y con un alto costo energético. Diversas proteínas de transporte reconocen marcas específicas, como la caperuza 5' (cap), para mediar el paso a través del NPC. Este nivel de control asegura que solo los mensajeros que han completado exitosamente su procesamiento (empalme, edición y poliadenilación) alcancen la maquinaria de traducción.

Regulación postranscripcional: silenciamiento génico en plantas

El silenciamiento génico es un tipo de regulación postranscripcional y se conoce mejor en plantas. Un ARN de doble cadena que puede ser de origen vírico, por ejemplo, con función de defensa de la planta, es reconocido por una enzima llamada Dicer con actividad ARNasa. Dicer corta el ARN y se genera un ARN de interferencia pequeño de doble cadena. El ARN de interferencia es reconocido por un complejo de silenciamiento inducido por ARN llamado RISC. Dentro de ese complejo, una de las subunidades tiene actividad helicasa y separa el ARN; se generan ARN monocatenarios de interferencia, que quedan unidos al complejo RISC. Ese

ARN, ahora monocatenario, busca regiones complementarias en otros ARN. Una vez que encuentra esas zonas, el complejo degrada ese ARN *target* (**Figura 4.26**).

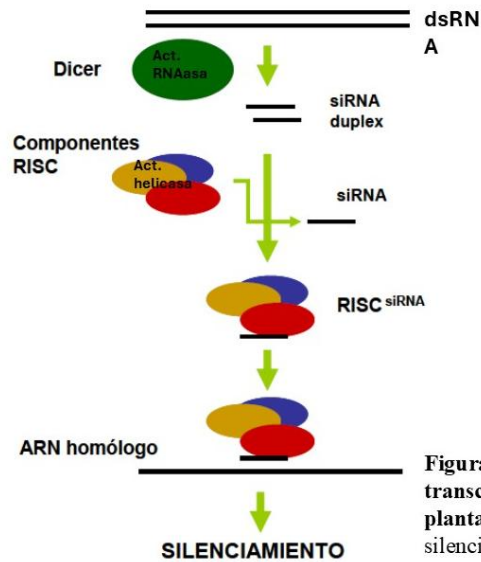


Figura 4.26. Regulación post-transcripcional: silenciamiento en plantas. RISC: Complejo de silenciamientos inducido por ARN.

BIBLIOGRAFÍA

- Alberts, B.; Bray, D.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K. & Watson, J. D. Molecular Biology of the Cell. 3rd ed. New York and London: Garland Publishing; 1994.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Watson, J. D. (2004). Biología molecular de la célula. Ed. Omega, 4.
- Alberts, B., et al. (2016). Biología Molecular de la Célula (6ª ed.). Ed. Omega.
- Lodish, H., Berk, A., Kaiser, C. A., Krieger, M., Bretscher, A., Ploegh, H., Amon, A., & Martin, K. C. (2016). Molecular Cell Biology (8th ed.). W. H. Freeman.

CAPÍTULO 5. BASES MOLECULARES DE LA TRADUCCIÓN

La traducción es el proceso mediante el cual la información del ARN mensajero se utiliza para sintetizar proteínas; en él participan principalmente el ribosoma, el ARN de transferencia (ARNt) y los aminoácidos. Este evento requiere una maquinaria molecular altamente especializada.

CÓDIGO GENÉTICO

El código genético es el conjunto de reglas mediante las cuales la secuencia de nucleótidos del ARN mensajero se traduce en una secuencia específica de aminoácidos durante la síntesis de proteínas. Este código se basa en tripletes de nucleótidos o codones. Matemáticamente, la combinación de las 4 bases nitrogenadas tomadas de a tres (4^3) genera 64 combinaciones posibles, lo cual es suficiente para codificar los 20 aminoácidos y las señales de puntuación (**Figura 5.1**). Los tripletes no se solapan entre sí y no comparten nucleótidos. Una vez que inicia la traducción según un marco de lectura, ese es el que determina la proteína que se formará.

| | | Segunda letra | | | | |
|---------------|---|--|--------------------------------------|--|---|------------------|
| | | U | C | A | G | |
| Primera letra | U | UUU } Phe UUC } UUA } Leu UUG } | UCU } UCC } Ser UCA } UCG } | UAU } Tyr UAC } UAA } Stop UAG } Stop | UGU } Cys UGC } UGA } Stop UGG } Trp | U C A G |
| | C | CUU } CUC } Leu CUA } CUG } | CCU } CCC } Pro CCA } CCG } | CAU } His CAC } CAA } Gin CAG } | CGU } CGC } Arg CGA } CGG } | U C A G |
| | A | AUU } AUC } Ile AUA } AUG } Met | ACU } ACC } Thr ACA } ACG } | AAU } Asn AAC } AAA } Lys AAG } | AGU } Ser AGC } AGA } Arg AGG } | U C A G |
| | G | GUU } GUC } Val GUA } GUG } | GCU } GCC } Ala GCA } GCG } | GAU } Asp GAC } GAA } Glu GAG } | GGU } GGC } Gly GGA } GGG } | U C A G |

Figura 5.1. Código genético.

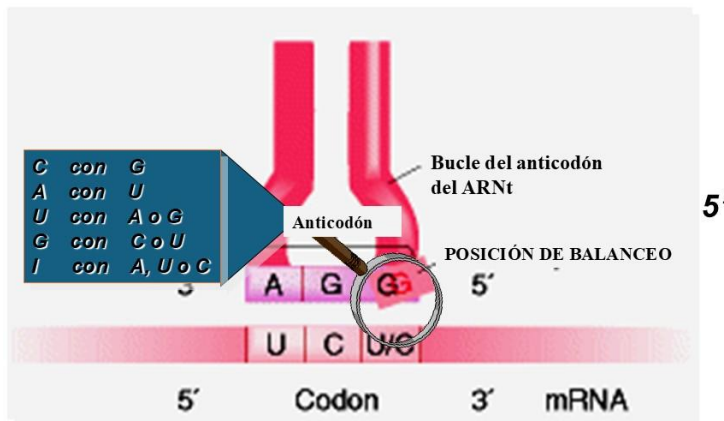
Propiedades del código genético

Se dice que el código es "degenerado" porque varios codones pueden codificar para un mismo aminoácido (codones sinónimos), minimizando el efecto de posibles mutaciones. La lectura de los marcos de lectura (*reading frames*) no es solapante. Un cambio en el nucleótido de inicio puede alterar completamente el producto proteico, fenómeno que explica las consecuencias de las mutaciones por inserción o deleción. Existen codones de inicio y codones de terminación.

En eucariotas, el proceso de iniciación estándar (modelo de escaneo) busca casi exclusivamente el primer AUG dentro de un contexto de secuencia favorable (secuencia de Kozak). Este codón codifica para metionina. Existen otros codones que pueden actuar como sitios de inicio en eucariotas, pero bajo condiciones muy específicas. Se denominan codones de inicio no-AUG. El codón CUG que codifica para leucina es el codón de inicio no-AUG más común en mamíferos. Se ha observado que ciertos genes (como algunos factores de crecimiento o protooncogenes) utilizan para generar isoformas de proteínas con extensiones en el extremo amino-terminal. El codón GUG que codifica para valina y el ACG, para treonina, también pueden funcionar como iniciadores, aunque con una eficiencia mucho menor que el AUG.

La célula utiliza estos codones alternativos principalmente para regulación génica y diversidad proteica. Si un AUG está en un contexto "débil" y un codón alternativo como CUG está en un contexto muy fuerte, la maquinaria de traducción podría iniciar en el CUG. También se ven con frecuencia en procesos de traducción viral dentro de células eucariotas o en situaciones de estrés celular donde los factores de inicio estándar están limitados.

Los codones de terminación, de paro o de *stop* no tienen información para ningún aminoácido; estos son: UAA, UAG y UGA. Por esto se dice que en realidad solo hay 61 codones porque estos tres no tienen información. En este contexto, si los apareamientos entre codón y anticodón fueran sólo de Watson y Crick, debería haber igual número de anticodones que de codones; es decir, 61. Sin embargo, en las células menor número de ARNt (contienen los anticodones). Esto significa que un mismo anticodón puede reconocer varios codones. La hipótesis del balanceo explica cómo sucede esta diferencia entre el número de codones y anticodones: la primera base del anticodón (posición 5') posee flexibilidad espacial, permitiendo apareamientos no convencionales, llamados enlaces de Wobble, con la tercera base del codón (posición 3') (**Figura 5.2**).



3' Figura 5.2. Interpretación del código genético con la hipótesis del balanceo. Tomado de Griffiths (2005).

ASPECTOS MOLECULARES DE LA TRADUCCIÓN

Características generales de la traducción

El proceso siguiente a la transcripción es la traducción del mensaje del ARNm en otro producto génico, las proteínas. Para la ejecución de la síntesis proteica, la célula requiere los siguientes elementos:

- ARNm: molécula portadora de los codones que dictan la secuencia de aminoácidos.
- Ribosomas
- ARN de transferencia (ARNt): moléculas adaptadoras que presentan bases infrecuentes y apareamientos de tipo Hoogsteen, fundamentales para mantener su estructura terciaria. Su estructura secundaria y terciaria les permite transportar aminoácidos específicos.
- ARNt iniciador (ARNt^{Met}), en eucariotas transporta metionina; en procariotas se utiliza formilmetionina (ARNat^{Met}).
- Aminoácidos: los 20 monómeros precursores.
- Aminoacil-ARNt sintetasas: enzimas críticas que garantizan la fidelidad del proceso al "cargar" el ARNt con el aminoácido correcto. Cofactores necesarios para las enzimas.
- Factores de traducción: proteínas reguladoras para la iniciación (IF), elongación (EF) y terminación (RF).
- Fuentes de energía: ATP para la activación de aminoácidos y GTP para el movimiento ribosomal y la fidelidad.

Estructura de los ribosomas

Los ribosomas son complejos ribonucleoproteicos formados por una subunidad mayor y una menor, cada una constituida por uno o más ARNr y varias proteínas de diversa masa molecular. Actúan como el sitio físico de síntesis, facilitando el desplazamiento del ARNm y la emergencia de la cadena polipeptídica a través de un túnel estructural.

Las dos subunidades se asocian mediante interacciones no covalentes; la subunidad menor se ubica en el “hueco” de la mayor, generando una hendidura o canal entre ambas por donde se posiciona el ARNm durante la traducción. En la subunidad mayor se localiza el centro peptidil transferasa, responsable de la formación del enlace peptídico, mientras que en la interfase entre ambas subunidades se distinguen tres sitios funcionales para el ARNt: el sitio A (aminoacil), donde ingresa el ARNt cargado; el sitio P (peptidil), que sostiene la cadena polipeptídica en crecimiento; y el sitio E (exit), por donde se libera el ARNt descargado. A medida que el ribosoma avanza sobre el ARNm, la cadena polipeptídica en formación emerge al exterior a través de un túnel en la subunidad mayor (**Figura 5.3**).

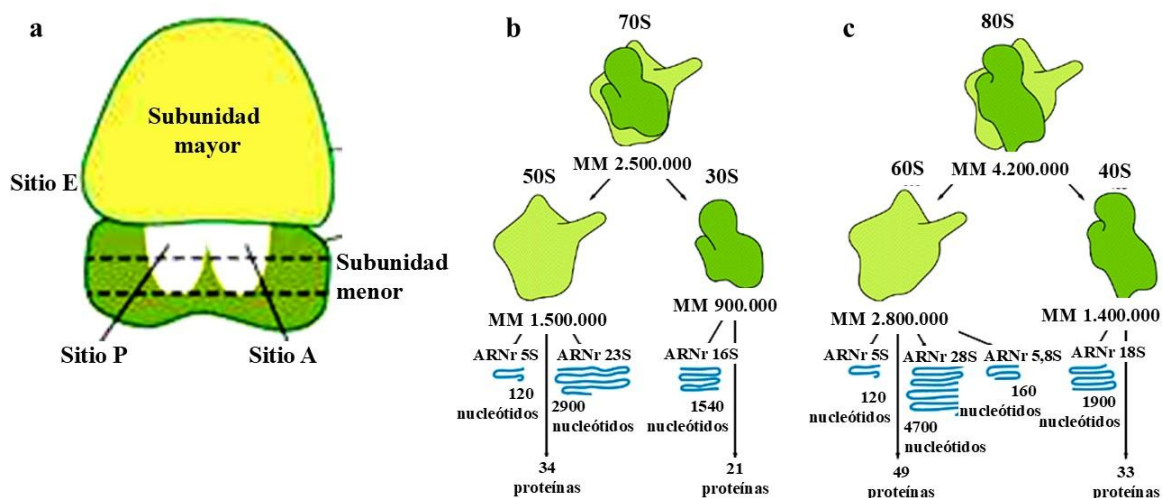


Figura 5.3. Estructura del ribosoma. a) Esquema general de un ribosoma. b) Ribosoma de procariontes. c) Ribosoma de eucariotas. Tomado de Alberts *et al.* (2005), con modificaciones.

Estructura de los ARNt

El ARN de transferencia (ARNt) es una molécula pequeña de aproximadamente 70–90 nucleótidos que cumple un papel fundamental en la traducción, actuando como adaptador entre el codón del ARNm y el aminoácido correspondiente (**Figura 5.4**). Su estructura secundaria adopta la forma característica de “trébol”, con varias regiones definidas: el brazo aceptor, el brazo D, el brazo anticodón, el brazo TΨC y un bucle variable (**Figura 5.4a**).

El brazo aceptor se localiza en el extremo 3' y contiene la secuencia conservada CCA, donde se une covalentemente el aminoácido. El brazo anticodón posee una secuencia de tres nucleótidos (anticodón) que se aparea de manera complementaria con el codón del ARNm. Los brazos D y TΨC participan en el correcto plegamiento y en el reconocimiento del ARNt por parte de las aminoacil-ARNt sintetasas y del ribosoma.

En su estructura tridimensional, el ARNt no tiene forma de trébol sino de "L", lo que permite posicionar en extremos opuestos el anticodón y el aminoácido unido (**Figura 5.4b**). Esta conformación es esencial para que el ARNt interactúe correctamente con el ribosoma durante la síntesis proteica y garantice la incorporación específica de aminoácidos en la cadena polipeptídica en crecimiento.

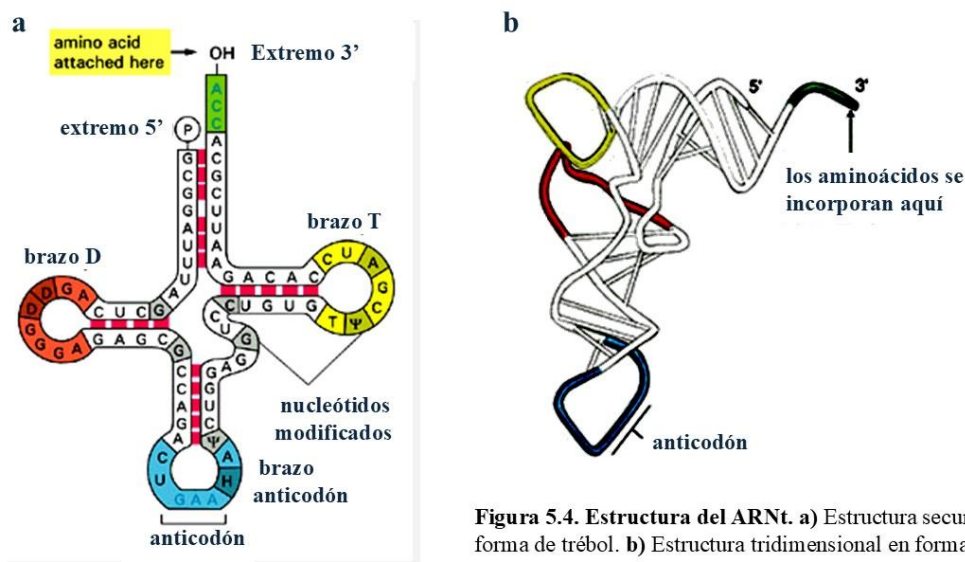


Figura 5.4. Estructura del ARNt. a) Estructura secundaria en forma de trébol. b) Estructura tridimensional en forma de "L". Tomado de Alberts *et al.* (1994).

ETAPAS DE LA TRADUCCIÓN

En el proceso de traducción se pueden distinguir varias etapas: una previa al proceso de traducción (activación de los aminoácidos precursores) y otras tres del proceso en sí mismo, bien diferenciadas: iniciación, elongación y terminación, análogo al de la replicación y la transcripción.

Activación de los aminoácidos (formación de aminoacil-ARNt)

La fase de activación define el papel conector del ARNt con los aminoácidos de la traducción, es el paso previo a la traducción, más importante de todo el proceso. La enzima aminoacil-ARNt sintetasa cataliza la unión del aminoácido al ARNt mediante un proceso dependiente de ATP (**Figura 5.5**). La enzima posee dos niveles de especificidad (sitio catalítico

y sitio de control o *editing*), asegurando que solo el par correcto aminoácido-ARNt sea liberado. Cada enzima aminoacil-ARNt sintetasa reconoce un único aminoácido, que es el que le da el nombre a la enzima, y también reconoce los ARNt cuyos anticodones corresponden a ese aminoácido; es decir, a sus codones sinónimos del código genético. Existen aproximadamente 20 aminoacil-ARNt sintetetas diferentes, una para cada aminoácido estándar.

Dado que el ribosoma no verifica si el aminoácido transportado por el ARNt es el correcto, el papel de la sintetasa es esencial para la fidelidad de la síntesis de proteínas y determina la especificidad primaria de la traducción.

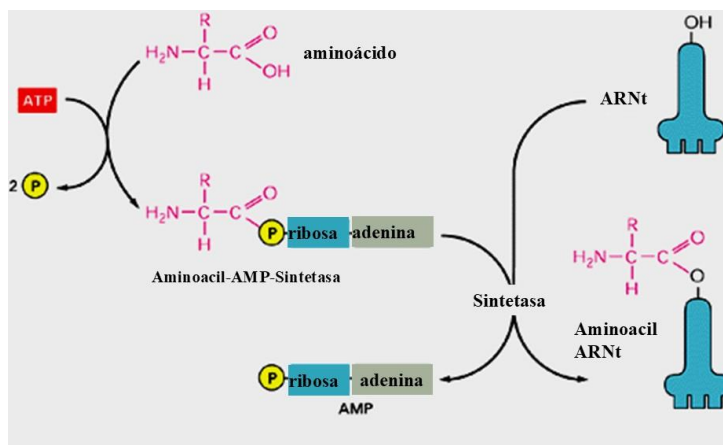


Figura 5.5. Activación del aminoacil-ARNt. El ARNt se carga con el aminoácido. Tomado de Alberts *et al.* (1994).

La especificidad de la sintetasa se basa en el reconocimiento molecular preciso en su centro activo. Este control se ejerce mediante dos filtros principales: el filtro de exclusión por tamaño y forma y la actividad de corrección (**Figura 5.6**). El primer filtro se refiere al sitio de unión del aminoácido, este está diseñado para optimizar las interacciones no covalentes (puentes de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals) con un aminoácido específico. Los aminoácidos de mayor tamaño son excluidos por impedimento estérico, mientras que aquellos más pequeños o con grupos funcionales distintos no logran establecer las interacciones suficientes para estabilizarse en el centro catalítico. El segundo filtro es de control o edición; en los casos donde un aminoácido estructuralmente similar (análogo) logra ingresar al sitio activo (por ejemplo, la valina en el sitio de la isoleucina), la enzima activa este sitio. Si las interacciones no son óptimas, el aminoácido incorrecto es hidrolizado y eliminado antes de unirse al ARNt, permitiendo que el proceso se reinicie hasta acoplar el sustrato legítimo.

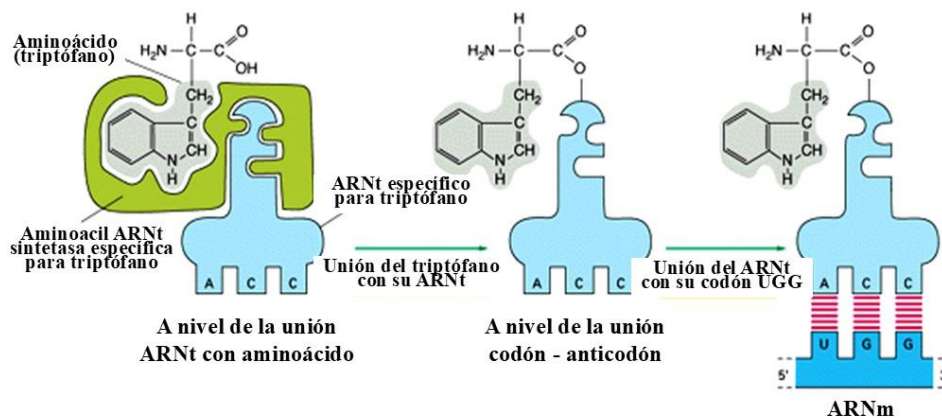


Figura 5.6. Especificidad de la carga del aminoácido. Tomado de Alberts *et al.* (1994), con modificaciones.

De manera análoga, la enzima debe discriminar entre diversas moléculas de ARNt. Esta selección depende de la morfología tridimensional del ARNt y del reconocimiento de nucleótidos de identidad, situados frecuentemente en el brazo aceptor y en el asa del anticodón. Solo cuando existe una correspondencia perfecta entre el aminoácido previamente activado y el ARNt posicionado en la enzima, se procede a la formación del enlace éster que define al aminoacil-ARNt.

La fidelidad de la traducción no depende de un único evento; se divide en dos niveles jerárquicos de especificidad (Tabla 5.1). Esta dualidad garantiza que el flujo de información desde el ácido nucleico hacia la proteína sea preciso, siendo la sintetasa el verdadero "traductor" del código, ya que físicamente une el mundo de los nucleótidos con el de los aminoácidos.

Tabla 5.1. Niveles de especificidad que mantienen la fidelidad durante la traducción

| Nivel de Especificidad | Responsable | Mecanismo |
|-----------------------------------|------------------------------------|---|
| Primario (Pretraduccional) | Aminoacil-ARNt sintetasa | Selección del aminoácido y su ARNt correspondiente (carga del ARNt). Paso crítico, se define la fidelidad bioquímica. |
| Secundario (Ribosomal) | Interacción codón-anticodón | Reconocimiento por complementariedad de bases en el sitio A del ribosoma. Asegura que el ARNt ya cargado sea el solicitado por el mensaje del ARNm. |

Iniciación de la traducción

En los organismos procariotas, el primer aminoácido incorporado es la N-formilmetionina (fMet). El reconocimiento del sitio de inicio no depende de un escaneo desde el extremo 5', sino de la interacción entre el ARNm y el ARN ribosómico. Se reconoce la secuencia Shine-

Dalgarno, una región del ARNm rica en purinas (AGuAGGU) situada corriente arriba del codón de inicio. Esta secuencia se aparea de forma complementaria y antiparalela con el extremo 3' del ARNr 16S (rico en pirimidinas) de la subunidad menor (30S). Esta interacción asegura que el codón de inicio (AUG) quede posicionado exactamente en el sitio P, aproximadamente 10 nucleótidos corriente abajo de la secuencia Shine-Dalgarno (**Figura 5.7**).

En eucariotas, se reconoce la secuencia de Kozak, dentro de la cual se encuentra el codón de inicio. El proceso es más complejo y está mediado por una numerosa familia de factores de inicio eucarióticos (eIF). Tras ser sintetizados en el nucleolo y exportados al citoplasma, los ribosomas se mantienen disociados en sus subunidades (40S y 60S) gracias a la unión de factores proteicos que evitan su reasociación prematura.

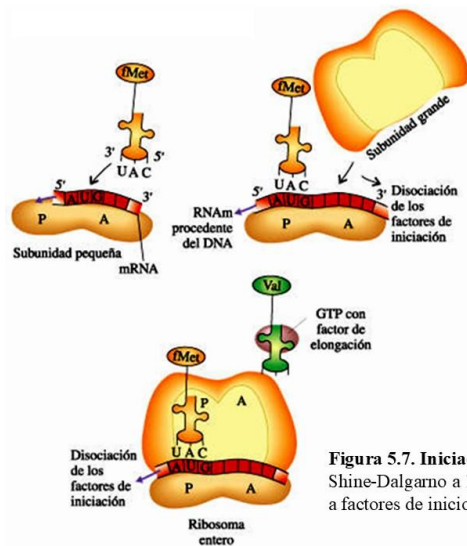


Figura 5.7. Iniciación de la traducción en procariotas. Se reconoce la secuencia de Shine-Dalgarno a 10 nucleótidos corriente abajo. El ribosoma se ensambla junto a factores de inicio. Tomado de Lodish *et al.* (2016).

Se forma el complejo de preiniciación (43S) a través de la unión del ARNt iniciador ($\text{ARNt}_i^{\text{Met}}$, que porta metionina) con el factor eIF2-GTP. Este ARNt iniciador es específico y diferente de los ARNt que incorporan metionina en posiciones internas de la proteína, lo que le permite reconocer el codón de inicio y posicionarse directamente en el sitio P. Este complejo ternario se posiciona directamente en el sitio P de la subunidad menor al asociarse con el ARNm, lo que permite al ARNt iniciador reconocer el codón de inicio; a diferencia de los demás ARNt, que durante la elongación ingresan inicialmente al sitio A del ribosoma. Otros factores reconocen la estructura de la caperuza 5' (cap) del ARNm y reclutan a la subunidad menor. Esta se desliza sobre el mensajero hasta identificar el codón de inicio (el cual suele estar inserto en la secuencia de Kozak). Una vez reconocido el AUG, se produce la hidrólisis del GTP, lo que provoca la liberación de los factores de inicio y permite el acoplamiento de la subunidad mayor (60S). Este

evento marca la formación del complejo de iniciación funcional, quedando el sitio A (aminoacilo) libre para recibir el segundo aminoacil-ARNt (**Figura 5.8**).

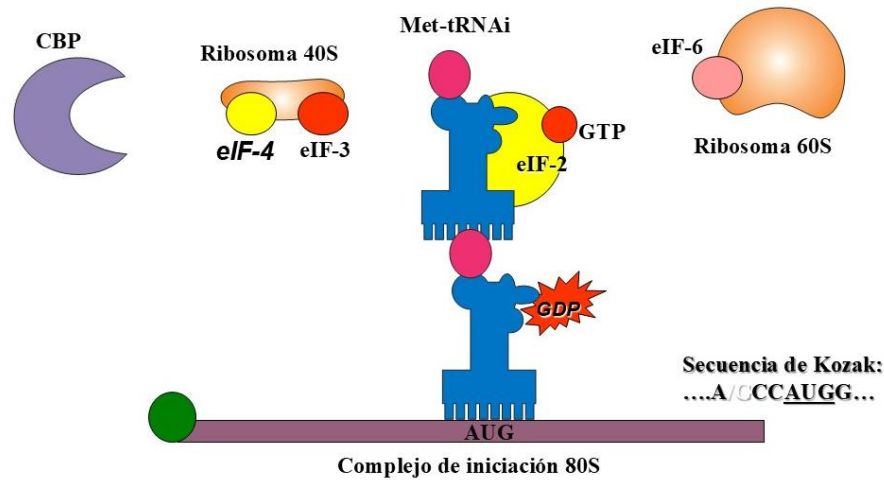


Figura 5.8. Iniciación de la traducción en eucariotas.

Elongación de la traducción

La elongación es un proceso cíclico y altamente regulado que permite la adición sucesiva de aminoácidos a la cadena polipeptídica en formación. Este proceso depende de la hidrólisis de nucleótidos de alta energía (GTP) y de la acción de proteínas auxiliares denominadas factores de elongación (**Figura 5.9**).

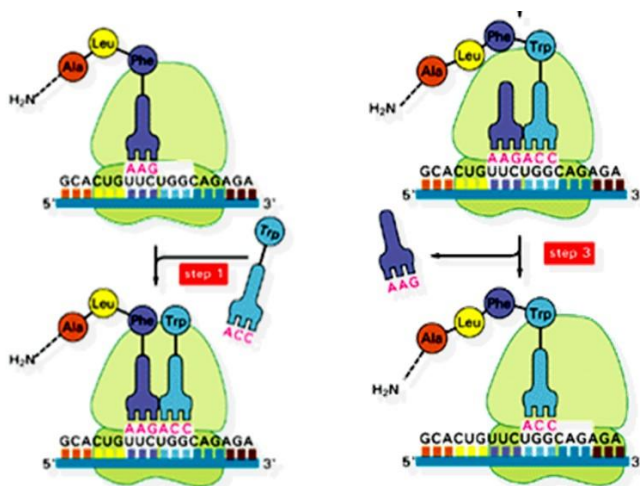


Figura 5.9. Elongación de la traducción.
 Tomado de Alberts *et al.* (1994).

El primer paso es la entrada del aminoacil-ARNt. El factor EF-1 α -GTP escolta al nuevo ARNt al sitio A del ribosoma. El eIF2 reconoce específicamente al ARNt iniciador (met-ARNt_i)

y posee una actividad intrínseca de GTPasa. Tras el reconocimiento del codón de inicio, el eIF2 cataliza la hidrólisis de su GTP unido a GDP, lo que provoca un cambio conformacional y la liberación del ARNt en el sitio P del ribosoma. Para participar en un nuevo ciclo de iniciación, el eIF2-GDP debe intercambiar el nucleótido difosfato por un nuevo GTP, proceso mediado por un factor de intercambio de nucleótidos de guanina (GEF).

El segundo paso es la elongación propiamente dicha, requiere que cada aminoacil-ARNt entrante forme un complejo ternario con el factor de elongación EF-1 α (o EF-Tu en procariontas) unido a GTP. El complejo ternario (EF-1 α -GTP-ARNt) ingresa al sitio A (aminoacilo) del ribosoma. Una vez verificado el apareamiento codón-anticodón, el factor EF-1 α activa su capacidad de GTPasa. La hidrólisis del GTP a GDP genera el gasto energético necesario para que el factor se disocie del ARNt, permitiendo que este se posicione correctamente en el centro peptidil-transferasa del ribosoma. El factor EF-1 α -GDP es inactivo y debe ser reciclado. Un factor de intercambio específico facilita la liberación del GDP y la unión de un nuevo GTP, restaurando la capacidad del factor para escoltar a un nuevo aminoacil-ARNt.

El tercer y último paso de la elongación es la síntesis del enlace peptídico y translocación. Tras la liberación del factor, la enzima peptidil-transferasa (una actividad ribozímica de la subunidad mayor) cataliza la formación del enlace peptídico. Posteriormente, el ribosoma avanza tres nucleótidos a lo largo del ARNm mediante un proceso de translocación mediado por el factor EF-2 (EF-G en procariontas) con gasto adicional de GTP, desplazando el peptidil-ARNt al sitio P y dejando el sitio A disponible para un nuevo ciclo. En la **Figura 5.10** se puede observar la translocación del ribosoma en un organismo procarionta.

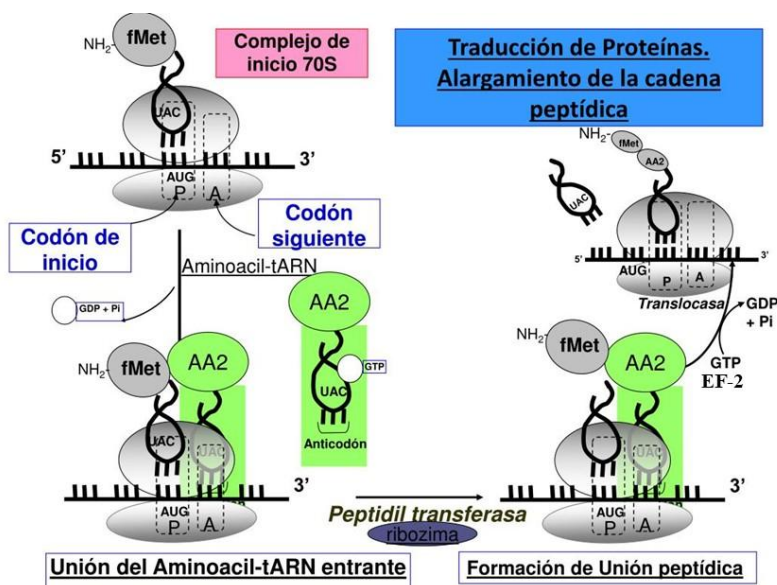


Figura 5.10. Translocación en la elongación de la traducción.

Terminación de la traducción

El proceso concluye al alcanzar un codón de parada (UAA, UAG o UGA). Al no existir ARNt complementarios, el sitio A es ocupado por un factor de liberación (RF). Este promueve que una molécula de agua ataque el enlace éster entre el péptido y el ARNt, provocando la hidrólisis y liberación de la proteína terminada y la disociación del complejo ribosomal (**Figura 5.11**).

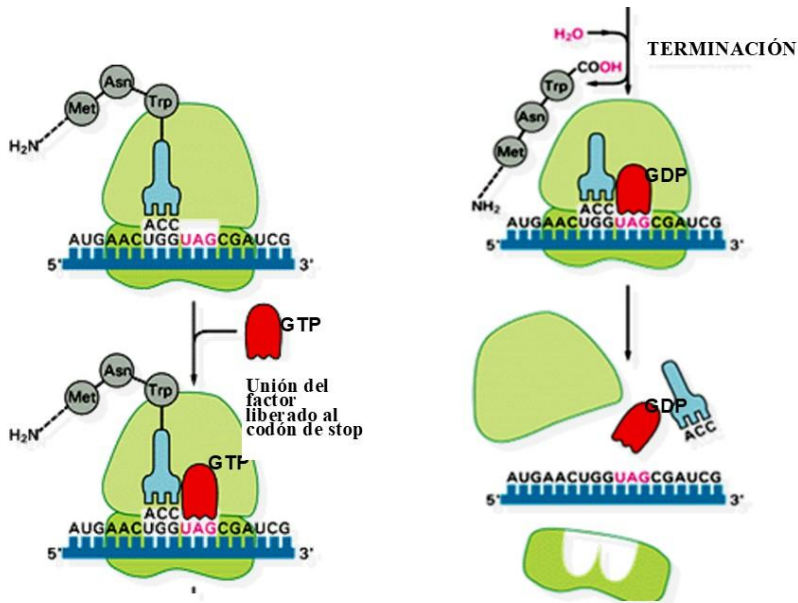


Figura 5.11. Terminación de la traducción. Tomado de Alberts *et al.* (1994), con modificaciones.

POLIRRIBOSOMAS Y SÍNTESIS SIMULTÁNEA DE PROTEÍNAS

Durante la traducción, una misma molécula de ARNm puede ser leída simultáneamente por varios ribosomas formando una estructura denominada polisoma o polirribosoma (**Figura 5.12**). Cada ribosoma inicia en el extremo 5', avanza a lo largo del mensajero sintetizando su propia cadena polipeptídica y se desprende al llegar al codón de terminación. De este modo, múltiples copias de una misma proteína pueden producirse de manera rápida y eficiente a partir de un único ARNm.

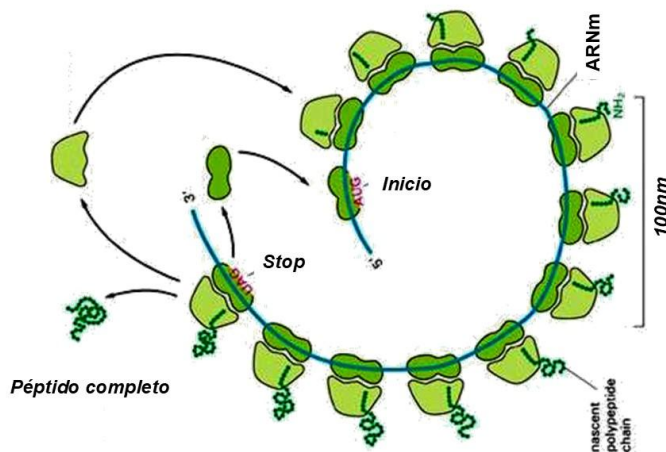


Figura 5.12. Polirribosomas y síntesis simultánea de proteínas. Tomado de Alberts *et al.* (1994), con modificaciones.

MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES

Tras la finalización de la traducción, la cadena polipeptídica resultante rara vez es funcional de manera inmediata. Para alcanzar su conformación biológicamente activa y su localización definitiva, la proteína debe someterse a un conjunto de procesos denominados modificaciones postraduccionales y mecanismos de tráfico celular. Estos incluyen el procesamiento del polipéptido; plegamiento y conformación molecular; tráfico y direccionamiento celular; y degradación.

Procesamiento del polipéptido

Para adquirir su funcionalidad, muchas proteínas requieren transformaciones estructurales específicas como escisión proteolítica y modificaciones químicas. La escisión proteolítica se da en algunas proteínas que se sintetizan como precursores inactivos (zimógenos o proproteínas). Estas necesitan la eliminación de segmentos específicos de su secuencia por acción de proteasas para activarse. Un ejemplo clásico es la conversión de proinsulina en insulina funcional.

Las modificaciones químicas consisten en la adición covalente de grupos funcionales, tales como la fosforilación (regulación de la actividad), glicosilación (esencial para el reconocimiento celular y la estabilidad) o lipidación (para el anclaje a membranas).

Plegamiento y conformación molecular

El plegamiento de la proteína es simultáneo al tráfico y a la maduración; es decir, que están íntimamente ligados. El correcto funcionamiento de una proteína depende de su estructura tridimensional. Para ello, es necesario su plegamiento de forma espontánea o mediada por proteínas especializadas denominadas chaperonas, carabinas o chaperoninas. En general, las proteínas de shock térmico 70 (Hsp70-ATP), estabilizan las cadenas polipeptídicas nacientes

protegiéndolas de la agregación; no contribuyen a que se plieguen, pero acompañan y evitan que se plieguen mal o que se agreguen entre ellas. Esto asegura que el polipéptido alcance su estado nativo (forma plegada y funcional de una proteína). Hay otro tipo de chaperonas, las del tipo de shock térmico 60, que en forma conjunta con la Hsp-10 forman como una estructura multimérica con forma de caja cilíndrica, en cuyo interior ingresan los polipéptidos y experimentan el plegamiento. Si la proteína no se pliega bien, puede volver a ingresar las veces que sea necesario hasta alcanzar la estructura nativa correspondiente.

Según su función y destino, algunas proteínas deben permanecer parcialmente desplegadas para atravesar membranas de orgánulos (como en la mitocondria) antes de alcanzar su plegamiento final.

Tráfico y direccionamiento celular o *protein sorting*

La célula posee un sistema de transporte altamente organizado para dirigir cada proteína a su compartimento específico (núcleo, mitocondria, RE, membrana plasmática o secreción). La información sobre el destino reside en la propia secuencia de la proteína, generalmente en el extremo amino-terminal, conocida como péptido señal o secuencia de direccionamiento. Estos últimos actúan como "códigos postales" moleculares que son reconocidos por receptores específicos y complejos de translocación que facilitan el ingreso de la proteína al orgánulo correspondiente (**Figura 5.13**).



Figura 5.13. Visión global del tráfico proteico. Tomado de Lodish *et al.* (2008), con modificaciones.

- Direccionamiento mitocondrial

Dado que la mayoría de las proteínas mitocondriales son codificadas por el genoma nuclear, estas deben ser importadas desde el citosol en un estado desplegado. Debido a la compleja arquitectura de la mitocondria (membrana externa, espacio intermembrana, membrana interna y matriz), la célula emplea sistemas de translocación específicos y secuencias de señalización complejas.

Las proteínas con destino a la matriz mitocondrial poseen una única secuencia de preselección o secuencia señal en su extremo amino-terminal, caracterizada por ser una hélice alfa anfipática (**Figura 5.14**). La secuencia es reconocida por receptores en el complejo translocasa de membrana exterior (TOM del inglés, *Translocase of the Outer Membrane*). Posteriormente, la proteína atraviesa el espacio intermembrana y es transferida al complejo translocasa de membrana interior (TIM, del inglés *Translocase of the Inner Membrane*). Una vez en la matriz, una peptidasa de procesamiento mitocondrial elimina la secuencia señal. Es importante destacar que, aunque la traducción inicia con metionina, este aminoácido suele ser eliminado junto con la secuencia señal, resultando en una proteína madura con un extremo N-terminal diferente.

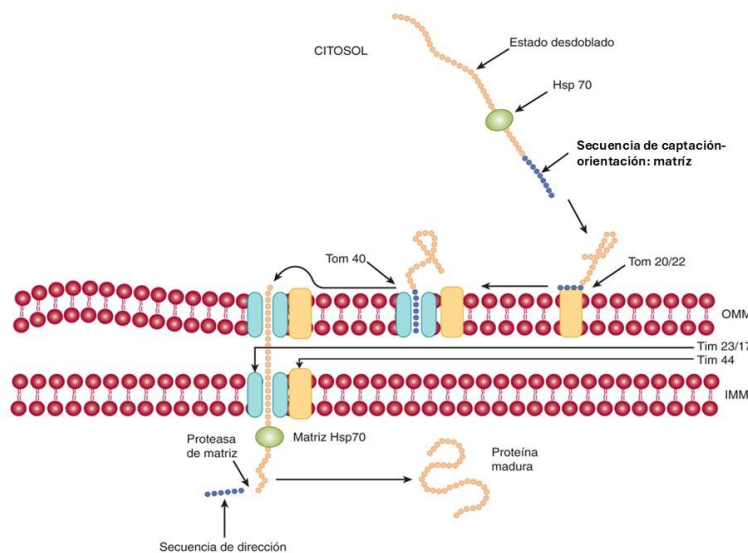


Figura 5.14. Direccionamiento mitocondrial con destino a la matriz. Tomado de Murray *et al.* (2007), con modificaciones.

El destino de las proteínas con destino al espacio intermembrana (como los citocromos) se explica mediante dos modelos principales que explican cómo las proteínas alcanzan este compartimento, la vía no conservadora (p. ej., citocromo b2) y la vía conservadora (p. ej., citocromo C1). Respecto a la vía no conservadora, la proteína posee una secuencia señal bipartita. La primera parte dirige la proteína hacia el complejo TIM, pero una segunda secuencia

de detención de la transferencia (hidrofóbica) impide que el resto del polipéptido entre a la matriz. La proteína queda anclada a la membrana interna y, posteriormente, una proteasa corta el dominio anclado, liberando la proteína soluble al espacio intermembrana. En la vía conservadora, la proteína ingresa completamente a la matriz, donde se elimina la primera secuencia señal. Esto expone una segunda secuencia de direccionamiento que redirige la proteína desde la matriz hacia el espacio intermembrana a través de la membrana interna (mecanismo similar al transporte de proteínas en bacterias, de ahí el nombre "conservador").

Las proteínas integrales de membrana de las mitocondrias requieren señales que detengan su translocación y faciliten su inserción lateral en la bicapa lipídica. Las proteínas de membrana externa poseen señales de direccionamiento que no suelen ser escindidas. Las proteínas con estructura de "barril beta" (como las porinas) son insertadas por el complejo de la maquinaria de ensamblaje y destino (SAM, del inglés *Sorting and Assembly Machinery*) tras atravesar el complejo TOM. Las proteínas de membrana interna contienen una secuencia señal de importación seguida de segmentos de aminoácidos hidrófobos que actúan como señales de parada. Dependiendo de la proteína, la secuencia señal puede ser eliminada en la matriz antes de que la proteína madura se inserte definitivamente en la membrana interna.

- Vía secretora

La vía secretora representa un sistema altamente dinámico de compartimentos comunicados mediante transporte vesicular. Este sistema incluye el retículo endoplasmático (RE), el aparato de Golgi (AG), los lisosomas y la membrana plasmática. El flujo de proteínas a través de esta vía es esencial para la secreción celular, la renovación de la superficie celular y la degradación macromolecular (**Figura 5.15**).

A diferencia de las proteínas mitocondriales, las proteínas de la vía secretora inician su ingreso al RE de manera simultánea a su síntesis, proceso denominado translocación cotraduccional (**Figura 5.16**). Al emerger del ribosoma, una secuencia señal hidrofóbica es reconocida por la partícula de reconocimiento de la señal (SRP). Esta última pausa temporalmente la traducción para evitar el plegamiento prematuro en el citosol. El complejo ribosoma-SRP se dirige a la membrana del RE rugoso (RER), donde se une al receptor de la SRP. Esto facilita la transferencia del ribosoma a un canal proteico llamado translocón (complejo Sec61). Con gasto energético, el translocón se abre y la síntesis se reanuda, inyectando la cadena polipeptídica en el lumen del RE. Una peptidasa de la señal escinde la

secuencia orientadora, permitiendo que la proteína continúe su elongación y comience sus primeras modificaciones químicas, como la glicosilación.

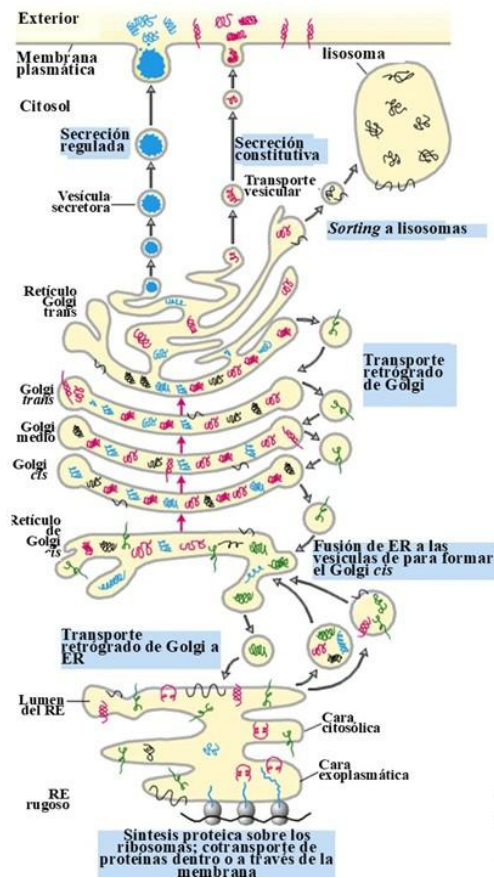


Figura 5.15. Vía secretora. Tomado de Lodish *et al.* (2000), con modificaciones.

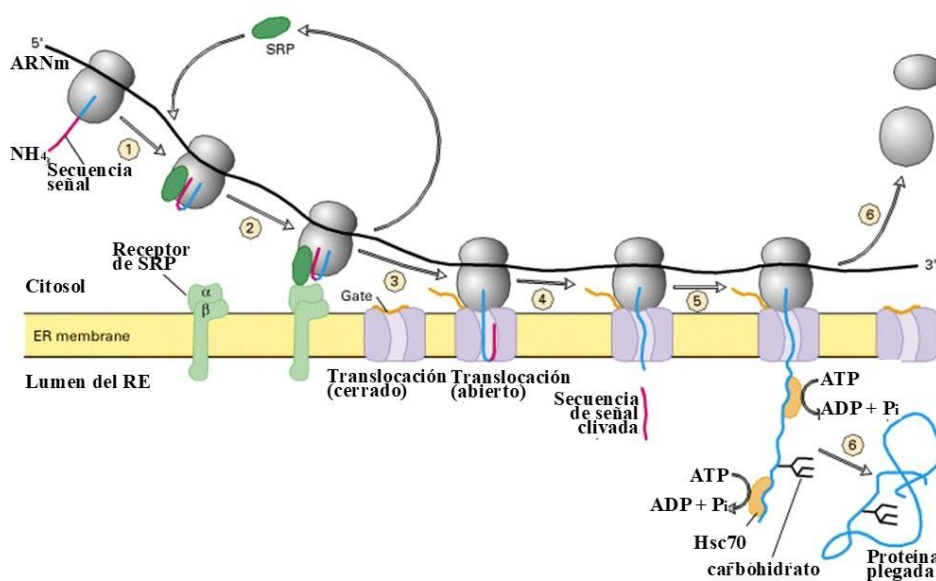


Figura 5.16. Biosíntesis proteica en RER. Tomado de Lodish *et al.* (2000), con modificaciones.

El RE actúa como un centro de control de calidad estricto. Las chaperonas asisten en el plegamiento correcto de las proteínas. Si una proteína se detecta como mal plegada, es retrotranslocada al citosol. Allí, se somete a la poliubiquitinación, una marca molecular que la destina a la degradación enzimática en el proteasoma.

Si una proteína residente del RE alcanza accidentalmente el aparato de Golgi, es reconocida por receptores específicos y devuelta al RE mediante vesículas de transporte retrógrado (**Figura 5.15**).

Las proteínas destinadas a la membrana plasmática o a las membranas de los orgánulos no se liberan al lumen, sino que quedan integradas en la bicapa lipídica durante la síntesis. Poseen una secuencia de detención de la transferencia (segmento hidrofóbico) que ancla la proteína a la membrana. Dependiendo de la orientación de la secuencia señal, el extremo amino (N) o carboxilo (C) puede quedar orientado hacia el citosol o hacia el lumen.

Las proteínas multipaso (politópicas) presentan múltiples dominios transmembrana (como los transportadores GLUT o receptores acoplados a proteínas G). Estos dominios se insertan de manera consecutiva como "lazos", alternando regiones citosólicas y luminales (**Figura 5.17**). Las modificaciones químicas, como las cadenas de carbohidratos, se sitúan siempre hacia la cara luminal (que posteriormente será la cara extracelular).

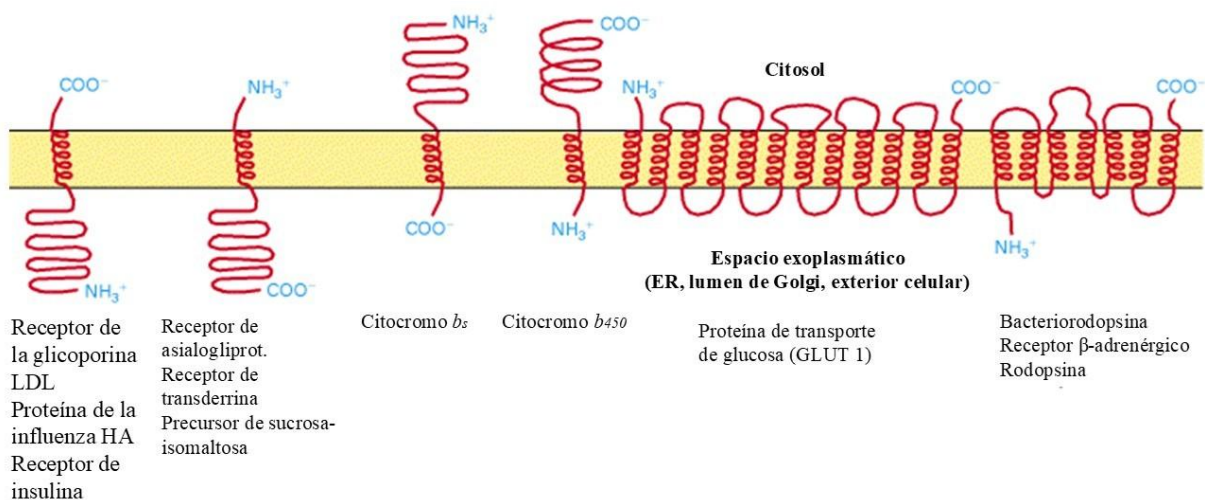


Figura 5.17. Alternativas de las proteínas de membranas. Tomado de Lodish *et al.* (2000).

Las proteínas correctamente plegadas viajan en vesículas hacia la red cis-Golgi. A medida que atraviesan las cisternas hacia la cara trans, sufren maduraciones complejas (remodelación de azúcares, sulfatación, etc.). Al salir del complejo, se clasifican según su destino: vía lisosómica, exocitosis constitutiva o exocitosis regulada. Las proteínas marcadas para la vía

lisosómica, comúnmente con manosa-6-fosfato, se dirigen a los lisosomas para cumplir funciones degradativas. Las proteínas de exocitosis constitutiva se transportan para el mantenimiento de la membrana plasmática y la matriz extracelular. En el caso de las proteínas de exocitosis reguladas como la insulina o neurotransmisores, se almacenan en vesículas de secreción y solo se liberan ante un estímulo específico.

La inserción de proteínas en la membrana del RE es un proceso coordinado en el que los segmentos hidrofóbicos del polipéptido determinan su anclaje. Se pueden distinguir dos categorías principales basadas en la complejidad de su translocación:

1. Proteínas de un solo dominio transmembrana (bitópicas): estas proteínas, como la glicoforina o el receptor de LDL, atraviesan la bicapa una sola vez (**Figura 5.18**). Presentan una secuencia de detención de la transferencia (*stop-transfer*), un segmento de aproximadamente 20 aminoácidos hidrófobos. Cuando este segmento ingresa al translocón, actúa como una señal de anclaje que detiene el paso de la proteína hacia el lumen. El canal del translocón se abre lateralmente, liberando el segmento hidrofóbico hacia la bicapa lipídica, donde queda anclado permanentemente. El resto de la cadena sigue sintetizándose hacia el citosol. Las modificaciones químicas (como la glicosilación) ocurren exclusivamente en el dominio que queda dentro del lumen del RE, el cual corresponderá posteriormente al dominio extracelular.

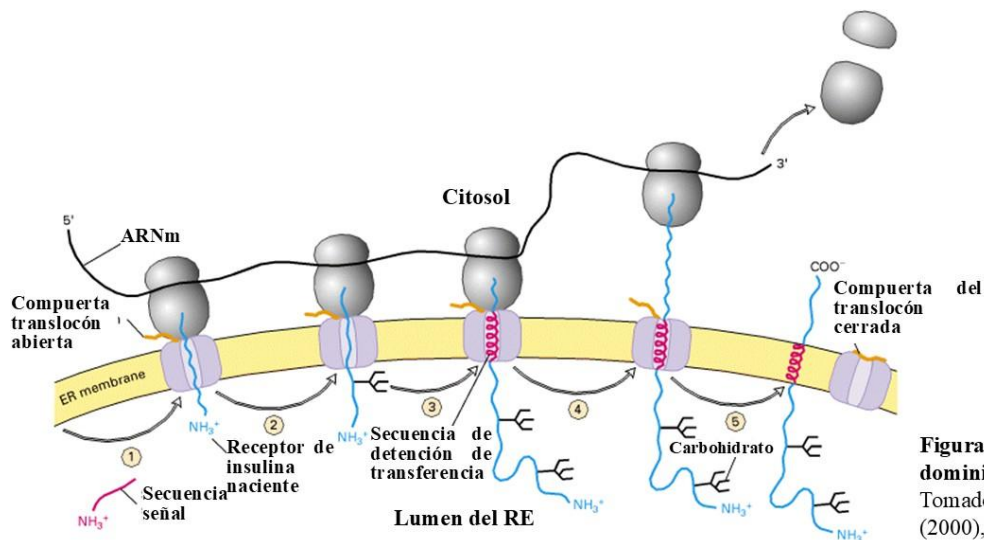


Figura 5.18. Proteína con un dominio transmembrana. Tomado de Lodish *et al.* (2000), con modificaciones.

2. Proteínas de múltiples dominios transmembrana (politópicas): las proteínas como el transportador de glucosa GLUT 1 (con 12 dominios) o los receptores acoplados a proteínas G (con 7 dominios) requieren un mecanismo de inserción secuencial. La traducción no se detiene; en su lugar, el polipéptido presenta alternancia entre secuencias de señal de inicio y de

detención. La primera secuencia contiene el inicio de la proteína. La siguiente detiene la transferencia, formando un "lazo" que atraviesa la membrana. Este proceso se repite sucesivamente, "tejiendo" la proteína en la bicapa a medida que el ribosoma avanza. Una vez insertados, los dominios son estables. Las regiones luminales siempre estarán orientadas hacia el interior de las vesículas de transporte y, finalmente, hacia el exterior de la célula tras la fusión con la membrana plasmática (**Figura 5.19**).

Al concluir la traducción del último dominio, el complejo se disocia. El ribosoma alcanza el codón de parada, se desprende del translocón y sus subunidades se reciclan. El ARNm es degradado, finalizando el ciclo de producción de esa unidad proteica. La proteína, ya anclada y orientada, es empaquetada en vesículas de COP II para iniciar su tránsito hacia el aparato de Golgi, manteniendo siempre la orientación establecida en el RE.

El translocón funciona como una "puerta inteligente" que decide, basándose en la hidrofobicidad, qué partes de la proteína deben ser segregadas al lumen (vía secretora soluble) y cuáles deben permanecer integradas en la estructura lipídica (vía de membrana).

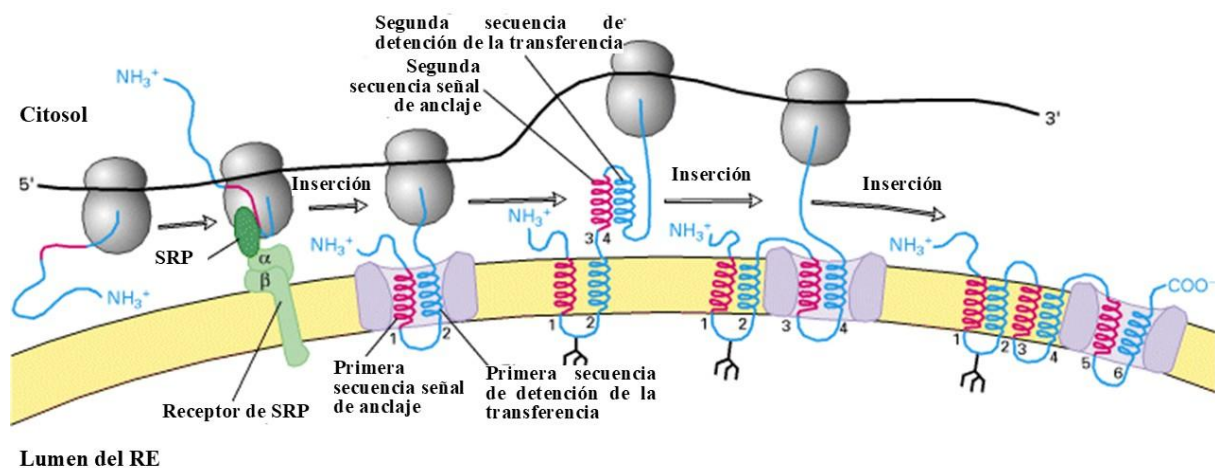


Figura 5.19. Proteína con varios dominios transmembrana. Tomado de Lodish *et al.* (2000), con modificaciones.

Ciclo de vida y degradación proteica

La homeostasis celular requiere un equilibrio estricto entre la síntesis y la degradación. Una vez que la proteína ha cumplido su ciclo de vida o si presenta daños estructurales, es marcada (frecuentemente por ubiquitina) para su degradación en el proteasoma o en los lisosomas. Este proceso recicla la proteína en sus aminoácidos constituyentes, los cuales quedan disponibles para una nueva síntesis proteica.

La degradación citosólica mediada por el sistema ubiquitina-proteasoma es el principal mecanismo de proteólisis citosólica para proteínas mal plegadas o aquellas cuya vida útil ha

concluido (control por proteólisis). La ubiquitina es una proteína pequeña y altamente conservada presente en todos los eucariotas. El marcaje de una proteína diana ocurre a través de una cascada enzimática altamente específica. En primer lugar, la enzima E1 activa la ubiquitina mediante la formación de un enlace tioéster de alta energía, proceso dependiente de ATP. La ubiquitina activada se transfiere a la enzima E2 (enzima conjugadora), que actúa como portadora del grupo ubiquitilo. La enzima E3 ligasa es la encargada del reconocimiento del sustrato, identifica secuencias específicas en la proteína diana, como las cajas de destrucción (señales de degradación o degrones). La E3 cataliza la unión covalente de la ubiquitina a un residuo de lisina de la proteína diana. Este proceso se repite sucesivamente hasta formar una cadena de poliubiquitina, señal conocida coloquialmente como "el beso de la muerte", que etiqueta irreversiblemente a la proteína para su destrucción (**Figura 5.20**).

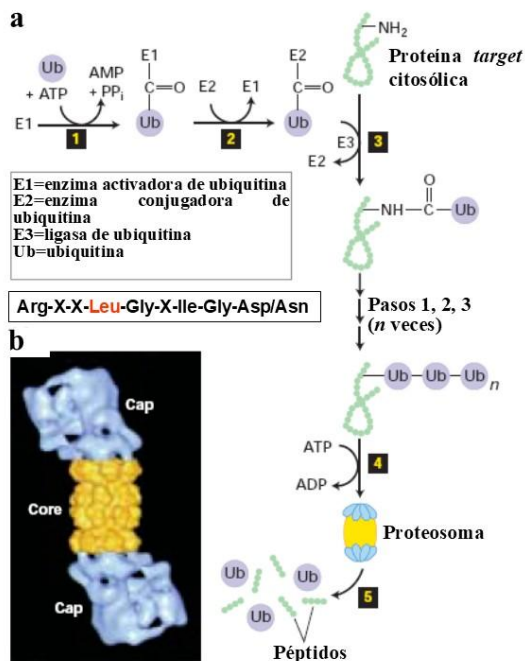


Figura 5.20. Degradación proteica citosólica. a) Mecanismo de ubiquitinización. b) Proteosoma, complejo proteinasa multicatalítico. Tomado de Lodish *et al.* (2000), con modificaciones.

Una vez poliubiquitinizada, la proteína es dirigida al proteosoma, una estructura macromolecular cilíndrica cuyos extremos reconocen la cadena de ubiquitina, la eliminan para su reciclaje y despliegan la proteína diana utilizando energía de ATP. La proteína desplegada ingresa al núcleo central o centro catalítico, donde diversas proteasas hidrolizan los enlaces peptídicos. El proceso libera oligopéptidos cortos que luego son degradados por peptidasas citosólicas hasta aminoácidos libres.

Un aspecto clave de este sistema es su reversibilidad parcial, las moléculas de ubiquitina no se degradan dentro del proteosoma. Son liberadas por enzimas desubiquitinizantes antes de

la proteólisis del sustrato, permitiendo que regresen a su estado nativo y queden disponibles para un nuevo ciclo de marcaje.

Por otra parte, la degradación lisosomal se lleva a cabo dentro del lumen lisosomal. Los lisosomas se forman por proteínas y por enzimas hidrolíticas provenientes del aparato de Golgi. En el interior de los lisosomas el pH es ácido (4.8 a 5.0), crucial para la actividad de las enzimas proteolíticas denominadas catepsinas. Estas proteasas son responsables de la hidrólisis de los enlaces peptídicos, degradando las proteínas hasta sus aminoácidos constituyentes para su posterior reciclaje en el citosol.

Dependiendo del origen del material a degradar, se distinguen dos procesos fundamentales: la vía heterofágica y la autofágica. La vía heterofágica o endocitosis se activa para procesar macromoléculas provenientes del medio extracelular. Las proteínas como las lipoproteínas de alta densidad o HDL y otras Lp son capturadas mediante endocitosis mediada por receptores. Las vesículas resultantes (endosomas) se fusionan con los lisosomas para la digestión del material capturado. Permite la adquisición de nutrientes y la regulación de los niveles de lípidos y proteínas plasmáticas.

La vía autofágica es el proceso de degradación de componentes propios de la célula (sustratos intracelulares). Los componentes celulares obsoletos o dañados, como porciones de la membrana plasmática, receptores hormonales internalizados o ribosomas, son aislados por membranas del RE para formar un autofagosoma, que posteriormente se fusiona con el lisosoma. Es vital para la homeostasis celular, el recambio de orgánulos y la respuesta ante situaciones de ayuno o estrés metabólico.

REGULACIÓN DE LA TRADUCCIÓN

La célula ha desarrollado mecanismos sofisticados para acoplar la síntesis proteica a la disponibilidad de cofactores esenciales, evitando el gasto energético innecesario. Este control se ejerce principalmente en la etapa de iniciación, ya sea de forma global o sobre mensajeros específicos.

Un ejemplo es el control global mediado por fosforilación del factor eIF2 se da en los precursores de los eritrocitos (reticulocitos). Existe un control estricto para asegurar que la síntesis de globina sea estequiométricamente proporcional a la disponibilidad del grupo hemo (**Figura 5.21**). El factor de iniciación eIF2 unido a GTP escolta al met-ARN_t al ribosoma. Tras la hidrólisis de GTP a GDP, el factor debe intercambiar el nucleótido para reactivarse. Ante la

ausencia de hierro o grupo hemo, se activa una quinasa específica (HRI) que fosforila la subunidad alfa de eIF2. En consecuencia, el factor eIF2 fosforilado queda secuestrado en un complejo inactivo con su factor de intercambio (eIF2B), impidiendo la regeneración de eIF2-GTP. Esto provoca una inhibición generalizada del inicio de la traducción en la célula; las cadenas ya iniciadas finalizan su elongación, pero no se pueden ensamblar nuevos complejos de iniciación.

A diferencia del control global, la síntesis de la ferritina (proteína encargada del almacenamiento de hierro) se regula de manera selectiva mediante estructuras en la región no traducida (UTR). El ARNm de la ferritina posee una estructura de bucle denominada elemento de respuesta al hierro (IRE) localizada en su extremo 5' UTR. Cuando los niveles de hierro son bajos, una proteína reguladora (IRP) se une al IRE con alta afinidad. Esta unión actúa como un impedimento físico que bloquea el escaneo de la subunidad menor del ribosoma, impidiendo que alcance el codón de inicio. No se sintetiza ferritina, ya que no hay hierro excedente para almacenar. Al aumentar la concentración de hierro citosólico, este se une directamente a la IRP, provocando un cambio conformacional que le hace perder su afinidad por el ARNm. Al liberarse el IRE, el extremo 5' queda disponible para la maquinaria de traducción, permitiendo la síntesis de ferritina de forma proporcional a la carga de hierro.

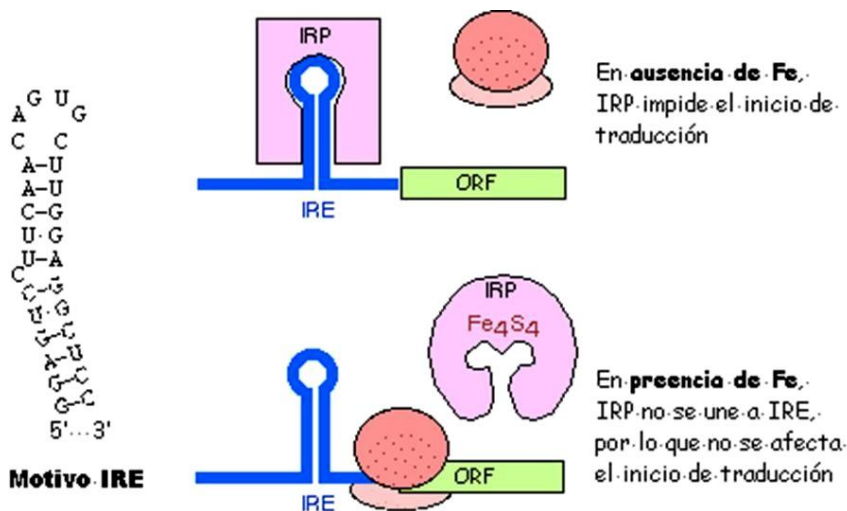


Figura 5.21. Control de la frecuencia de la traducción. Ejemplo de la ferritina. Tomado de Claros <http://www.nitrógeno.uma.es/bmb/q/av/>

En la **Figura 5.22** se resumen los niveles de regulación de la expresión génica en eucariotas.

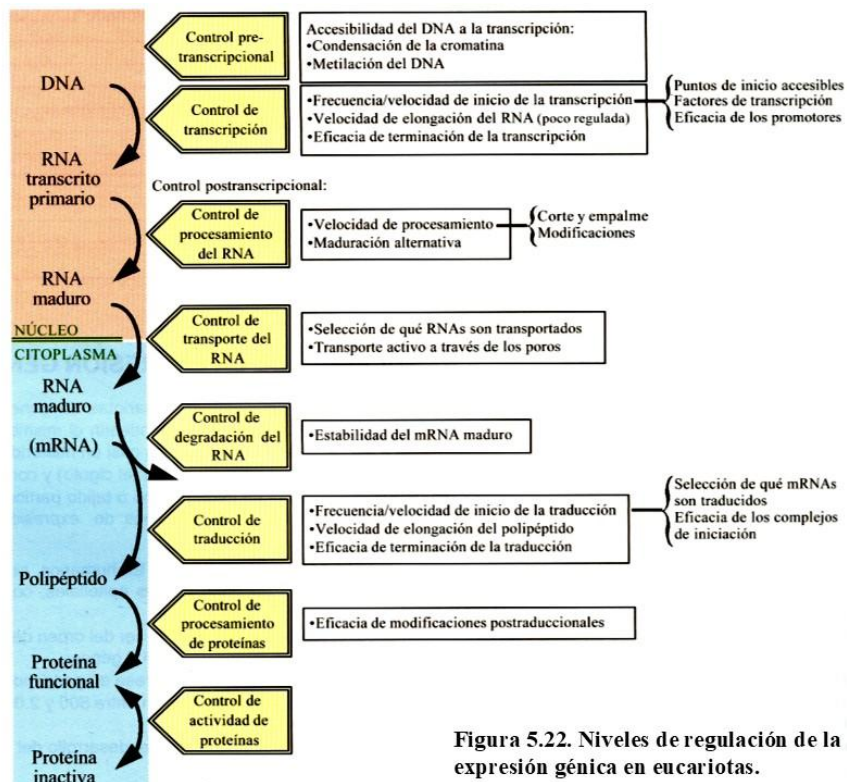


Figura 5.22. Niveles de regulación de la expresión génica en eucariotas.

MÉTODOS MOLECULARES PARA EL ESTUDIO DE PROTEÍNAS

Esta sección se encuentra en la sección de fundamento teórico del Taller y TP 4.

TALLER Y TRABAJO PRÁCTICO n.º 4: ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

El estudio de las proteínas es fundamental para comprender los procesos celulares y moleculares que sustentan la vida. En el laboratorio de Biología Molecular, las técnicas de electroforesis de proteínas y Western blot constituyen herramientas esenciales para el análisis, la separación e identificación de proteínas.

La electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) permite separar las proteínas según su tamaño, aplicando un campo eléctrico que impulsa su migración a través de una matriz porosa. Esta técnica posibilita observar la pureza, el peso molecular y el perfil proteico de una muestra biológica.

La técnica de Western blot combina la separación electroforética con la detección inmunológica, utilizando anticuerpos específicos que reconocen proteínas de interés. Esta metodología es ampliamente empleada en investigación biomédica, diagnóstico molecular y biotecnología, ya que permite confirmar la presencia y cuantificar la expresión de determinadas proteínas.

Además de su valor analítico, estas técnicas ofrecen a los estudiantes la oportunidad de integrar conocimientos sobre la estructura y función proteica, técnicas experimentales y análisis de resultados, fortaleciendo su comprensión de los mecanismos moleculares que regulan la vida.

OBJETIVOS

Los objetivos del taller n.º 4 son:

- Comprender el fundamento del método colorimétrico de Bradford para la determinación de la concentración proteica en muestras biológicas reflexionando sobre su importancia como paso previo en procedimientos experimentales en biología molecular.
- Comprender los principios teóricos que sustentan las técnicas básicas de aislamiento y separación de proteínas como SDS-PAGE y Western blot.
- Reconocer la importancia del uso de anticuerpos específicos en la detección inmunológica de proteínas.
- Interpretar esquemas y resultados de electroforesis y transferencia de proteínas y reflexionar sobre la aplicación de estas técnicas en la investigación biomédica y biotecnológica.

Los objetivos del TP n.º 4 son:

- Conocer y utilizar correctamente la curva estándar de albúmina sérica bovina (BSA) para cuantificar proteínas desconocidas.
- Realizar un gel de poliacrilamida, sembrar muestras proteicas y ejecutar el proceso de electroforesis (SDS-PAGE) siguiendo normas de seguridad y precisión técnica.
- Aprender sobre la transferencia de proteínas desde el gel a una membrana y su detección mediante anticuerpos.
- Analizar e interpretar los resultados espectrofotométricos y electroforéticos obtenidos.

FUNDAMENTO TEÓRICO DE LA EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS

La extracción de proteínas es una etapa fundamental en los estudios de biología molecular y bioquímica, ya que permite aislar las moléculas de interés desde tejidos, cultivos celulares o microorganismos. El método de extracción depende de la localización celular de las proteínas, pudiendo clasificarse en proteínas intercelulares, extracelulares y de transmembrana, ya que cada tipo presenta propiedades fisicoquímicas diferentes que requieren condiciones de ruptura y solubilización específicas.

Las proteínas intracelulares, citoplasmáticas y nucleares se encuentran dentro de la célula, principalmente en el citoplasma o asociadas a orgánulos y estructuras internas. Estas proteínas suelen ser hidrosolubles y relativamente fáciles de extraer con *buffers* acuosos suaves. El procedimiento general de extraer este tipo de proteínas conlleva una serie de pasos fundamentales:

1. Ruptura celular, se realiza por métodos físicos (sonicación, homogeneización, presión) o químicos (detergentes suaves, lisis alcalina) para liberar el contenido interno. La adición de *buffers* ayuda a liberar las proteínas intracelulares del interior de la célula sin alterar significativamente su estructura ni su función.
2. Extracción, para ello se utilizan *buffers*, los más comunes son el Tris-HCl y fosfatos conteniendo sales (NaCl, KCl), agentes quelantes (EDTA) y a menudo inhibidores de proteasas para evitar la degradación.
3. Centrifugación, se separan los restos celulares insolubles del sobrenadante que contiene las proteínas solubles.
4. Almacenamiento o purificación posterior según el análisis (Bradford, SDS-PAGE, Western blot, entre otros).

Las proteínas extracelulares se secretan al medio de cultivo o espacio extracelular, y suelen estar implicadas en procesos de comunicación, señalización o digestión enzimática. Se trata de proteínas fáciles de aislar al no requerir ruptura celular, pero pueden necesitar pasos adicionales de concentración y purificación. El procedimiento general para extraer este tipo de proteínas conlleva los siguientes pasos:

1. Recolección del medio extracelular o sobrenadante del cultivo.
2. Concentración de proteínas debido a que suelen encontrarse en baja concentración. Se puede realizar por precipitación con ácido tricloroacético o sulfato de amonio, filtración, o ultrafiltración.
3. Diálisis o intercambio de *buffer* para eliminar sales o compuestos interferentes.
4. Análisis o purificación mediante técnicas cromatográficas o electroforéticas.

Las proteínas transmembrana están ancladas a la bicapa lipídica, lo que les confiere regiones hidrofóbicas difíciles de solubilizar. Son esenciales en transporte, señalización y reconocimiento celular, pero su extracción es la más desafiante. Su manejo requiere equilibrio entre solubilización y conservación de la estructura nativa, ya que los detergentes fuertes pueden desnaturalizarlas. El procedimiento general para extraer las proteínas transmembrana son:

1. Aislamiento de fracciones de membrana mediante centrifugación diferencial o ultracentrifugación.
2. Solubilización utilizando *buffers* específicos conteniendo detergentes como el Tritón X-100, SDS, CHAPS o NP-40, que reemplazan los lípidos alrededor de las proteínas y las mantienen estables en solución. Los *buffers* también contienen agentes reductores y estabilizantes como el β -mercaptoetanol o glicerol.
3. Eliminación del detergente por diálisis o resinas específicas antes de los análisis estructurales o funcionales.

FUNDAMENTO TEÓRICO DE LA CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES POR EL MÉTODO DE BRADFORD

La cuantificación de proteínas totales es un paso fundamental en los procedimientos de análisis bioquímico y molecular, ya que permite conocer la concentración proteica presente en una muestra antes de realizar ensayos posteriores, como electroforesis o reacciones enzimáticas o técnicas más complejas como Western blot. Cuantificar las proteínas totales garantiza la

normalización de las muestras, condición indispensable para comparar resultados entre distintos tratamientos o condiciones experimentales. La elección del método de cuantificación depende del tipo de muestra, la concentración esperada de proteínas y los reactivos presentes en el medio. Existen diferentes métodos de cuantificación proteica, cada uno con fundamentos químicos distintos y niveles variables de sensibilidad y compatibilidad. Entre los más utilizados se encuentran el método de Bradford (Bradford, 1976); el método del biuret (Gornall *et al.*, 1949); el método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951); y el método del ácido bicinonínico (BCA) (Smith *et al.*, 1985).

El método de Bradford es uno de los procedimientos colorimétricos más utilizados para la cuantificación rápida y sensible de proteínas, ideal para análisis rápidos, muestras diluidas y entornos docentes, donde la sencillez y la rapidez son prioritarias. En el contexto de la Biología Molecular, la cuantificación mediante Bradford se utiliza frecuentemente como paso previo a la electroforesis en SDS-PAGE o Western blot, permitiendo igualar la cantidad de proteína cargada en cada carril del gel. Esto asegura comparaciones válidas entre muestras y evita interpretaciones erróneas en la detección de proteínas específicas. En cambio, los métodos de Lowry o BCA pueden ser preferibles en contextos donde se requiera mayor exactitud cuantitativa o tolerancia a interferencias químicas. Por ello, el método que se utilizará en el TP es el método de Bradford

El método de Bradford se basa en la interacción del colorante Coomassie Brilliant Blue G-250 con las proteínas bajo condiciones ácidas. Este colorante existe en tres formas: catiónica (roja), neutra (verde) y aniónica (azul). En ausencia de proteínas predomina la forma catiónica, que absorbe a 465 nm; sin embargo, al unirse a los residuos básicos (arginina, lisina, histidina) e hidrofóbicos de las proteínas, se estabiliza la forma aniónica azul, cuyo máximo de absorción ocurre a 595 nm. La intensidad del color azul desarrollado es directamente proporcional a la concentración de proteínas en la muestra, dentro de un rango lineal definido. Mediante una curva estándar, construida generalmente con albúmina sérica bovina (BSA) como proteína patrón, es posible interpolar la concentración de proteínas desconocidas.

A continuación, se detallan las múltiples ventajas de usar el método de Bradford en laboratorios de docencia e investigación:

- Es rápido; el color se desarrolla en menos de 10 minutos.
- Requiere bajo volumen de muestra y reactivos económicos.
- Posee alta sensibilidad, detectando concentraciones tan bajas como 1 µg/mL.

- Es compatible con la mayoría de los *buffers* biológicos, salvo aquellos con detergentes como SDS en concentraciones elevadas.
- El color resultante es estable por varios minutos, lo que permite lecturas precisas en espectrofotómetro.

No obstante, el método presenta algunas limitaciones. La respuesta del colorante varía según la composición aminoacídica de las proteínas, por lo que diferentes proteínas pueden producir curvas con pendientes distintas. Además, compuestos como detergentes, ácidos fuertes o altas concentraciones de sales pueden interferir con la unión del colorante.

El método del biuret es uno de los más antiguos. Se basa en la formación de un complejo violeta entre los enlaces peptídicos de las proteínas y los iones cúpricos en medio alcalino. Es un método simple, reproducible y con pocas interferencias; sin embargo, su sensibilidad es baja, detecta por encima de 1 mg/mL de proteínas.

El método de Lowry se basa en la reacción de Folin–Ciocalteu y combina la reacción del biuret con la reducción del reactivo de Folin por residuos aromáticos como la tirosina y el triptófano. Este método posee alta sensibilidad y estabilidad, pero es un procedimiento largo y susceptible a interferencias por compuestos reductores, detergentes y tampones.

El método del BCA es similar al de Lowry, utiliza la reducción de Cu^{2+} a Cu^+ por las proteínas, y este último reacciona con el BCA formando un complejo púrpura medible a 562 nm. Es un método de amplio rango lineal, alta estabilidad del color, y mayor compatibilidad con detergentes, pero su costo y tiempo de incubación son mayores a los del método de Bradford, lo que excede a un TP en un entorno docente.

FUNDAMENTO TEÓRICO DE LA ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)

La electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante es una técnica que separa proteínas según su peso molecular. Las muestras se mezclan con dodecil sulfato de sodio (SDS), un detergente aniónico que desnaturaliza las proteínas y les confiere una carga negativa proporcional a su longitud. Al aplicar un campo eléctrico, las proteínas migran a través del gel de poliacrilamida, cuya concentración define el tamaño de los poros y, por lo tanto, la resolución de separación. Las proteínas más pequeñas migran más rápidamente que las de mayor peso molecular.

Tras la corrida, las bandas se revelan mediante colorantes como Coomassie Brilliant Blue o

nitrate de plata, permitiendo observar el perfil proteico, evaluar la pureza de una muestra o estimar pesos moleculares mediante la comparación con un marcador estándar.

La técnica de la electroforesis se desarrolló en la década de 1940 y, desde entonces, ha evolucionado hasta convertirse en una herramienta fundamental y accesible para cualquier laboratorio de biología. Su principio básico consiste en el movimiento de moléculas cargadas eléctricamente a través de un medio, como un gel, cuando se aplica un campo eléctrico. La velocidad con la que estas moléculas migran depende de su carga eléctrica, forma y tamaño, lo que permite separarlas y analizarlas con gran precisión.

En el caso de las proteínas, su carga eléctrica está determinada por los grupos ionizables presentes en su estructura, los grupos amino y carboxilo terminales y las cadenas laterales de algunos aminoácidos. Cuando el pH del medio disminuye, grupos como el amino, el guanidinio e imidazol se ionizan, lo que aumenta la carga positiva de la proteína. Por el contrario, si el pH aumenta, los grupos carboxilo se ionizan, lo que otorga a la proteína una carga negativa. Cada proteína posee un valor de pH específico en el que su carga neta es cero; a este punto se le conoce como punto isoelectrico (pI). Comprender este concepto es esencial para explicar cómo migran las proteínas en distintos sistemas electroforéticos.

Los ácidos nucleicos también son moléculas cargadas, pero a diferencia de las proteínas, su carga proviene del esqueleto fosfato de la molécula, que aporta dos cargas negativas por nucleótido a pH fisiológico. Por este motivo, mantienen una relación carga/masa constante, lo que implica que su migración en el campo eléctrico depende principalmente de su tamaño.

La velocidad de migración (v) de cualquier molécula en un sistema electroforético depende de tres factores principales:

- E : la intensidad del campo eléctrico aplicado,
- q : la carga neta de la molécula,
- f : el coeficiente de fricción, que expresa la resistencia al movimiento y está influenciado por la viscosidad del medio (η) y el tamaño de la partícula (radio de Stokes, r).

Este fundamento físico explica por qué las moléculas más pequeñas o con mayor carga migran más rápido que las más grandes o con menor carga.

$$V = \frac{E \times q}{f}$$

donde v es la velocidad a la que se mueve la molécula; E es la intensidad del campo eléctrico en V/cm; q es la carga de la molécula y f es el coeficiente de fricción.

$$f = 6\eta\Pi \times r$$

donde η es la viscosidad del medio y r es el radio de Stokes para moléculas esféricas

Separación molecular por electroforesis

Cuando se mantienen constantes la intensidad del campo eléctrico y la viscosidad del medio, la velocidad de migración de una molécula en un sistema electroforético depende principalmente de su relación carga/masa. Este principio es la base de las técnicas electroforéticas: permiten separar moléculas según sus diferencias en dicha relación.

En el caso de los ácidos nucleicos, la situación es sencilla, ya que poseen una relación carga/masa constante debido a la presencia de grupos fosfato cargados negativamente a lo largo de su estructura. Esto implica que su separación en un gel electroforético ocurre exclusivamente en función del tamaño molecular, siendo las moléculas más pequeñas las que migran más rápido.

En cambio, las proteínas presentan mayor complejidad, ya que su carga varía según la composición de aminoácidos y el pH del medio. Para resolver este problema y lograr una separación dependiente solo del tamaño, se utiliza el detergente SDS. Este compuesto desnaturaliza las proteínas al romper sus estructuras terciarias y secundarias y unirse a ellas confiriéndoles una carga negativa uniforme. Así, la relación carga/masa se mantiene constante, lo que permite que la separación dependa únicamente del tamaño de la proteína, de forma análoga a lo que ocurre con los ácidos nucleicos.

La electroforesis puede realizarse sobre diferentes soportes, que funcionan como matrices a través de las cuales migran las moléculas. Algunos ejemplos incluyen:

- Soportes sólidos: como papel o acetato de celulosa (actualmente no son muy utilizados).
- Soportes en gel: como almidón (actualmente en desuso), agarosa o poliacrilamida.

Proceso de SDS-PAGE: realización del gel de poliacrilamida

La elección del soporte dependerá del tipo de molécula que se desee separar y del nivel de resolución requerido. Uno de los más utilizados en investigación son los geles de poliacrilamida, que son químicamente inertes y fáciles de preparar. El gel de poliacrilamida es el resultado de la polimerización química de una mezcla de acrilamida y bisacrilamida. La acrilamida es un monómero que forma polímeros lineales y la bisacrilamida forma enlaces cruzados entre las cadenas de acrilamida (**Figura 5.23**). Al variar las concentraciones de estos componentes y su proporción, se obtienen geles con diferentes tamaños de poro (siempre

menores que los poros de los geles de agarosa) adecuados para separar moléculas de distintos tamaños.

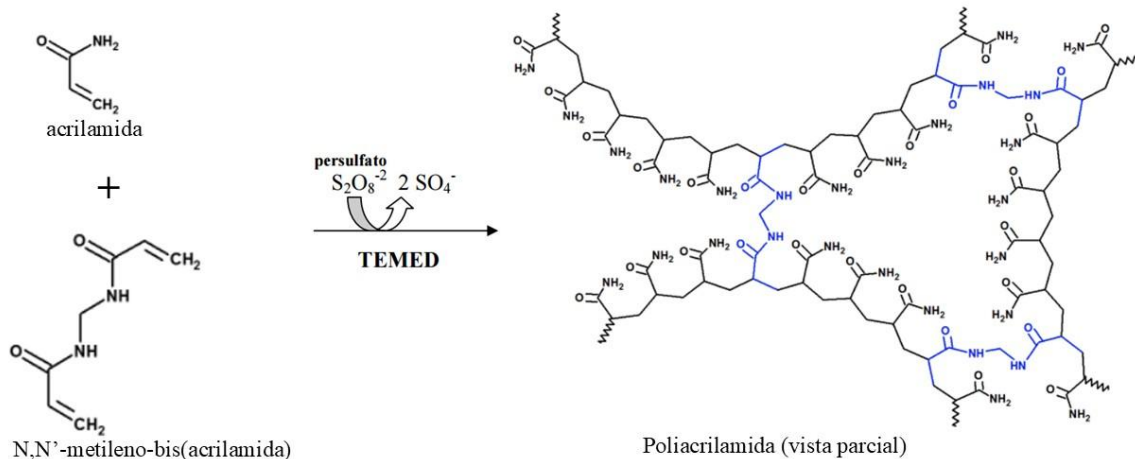


Figura 5.23. Reacción de polimerización de la acrilamida. Los catalizadores, como la amina TEMED, permiten la polimerización y la bis-acrilamida permite la generación de enlaces cruzados para la generación de los poros del gel, aporta reticulación al polímero, regulando su rigidez y porosidad. Tomado de Biomodel UAH con modificaciones.

Además de mezclarse las soluciones de acrilamida/bisacrilamida, con el *buffer* Tris-HCl, SDS, agua destilada, se añade el sistema iniciador de polimerización formado por el persulfato de amonio (APS) y N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina (TEMED). Ambos compuestos son agentes esenciales para la polimerización del gel de poli(acrilamida) y actúan en conjunto para generar los radicales libres necesarios que inducen la formación del polímero de acrilamida y bisacrilamida, que constituye la matriz del gel.

Una de las principales ventajas de los geles de poli(acrilamida) es su alta reproducibilidad: las variaciones entre geles son mínimas, a diferencia de lo que ocurre con los geles de agarosa. Además, su elevada resolución permite la separación de fragmentos de ADN que difieren tan solo en un par de bases, lo que los convierte en una herramienta indispensable para análisis detallados en Biología Molecular.

Tamaño de poro del gel

La determinación del tamaño del poro del gel de poli(acrilamida) se determina ajustando dos parámetros: contenido total de sólidos (%T) y la relación de bisacrilamida:acrilamida (%C).

El %T es la relación de la suma de acrilamida y bisacrilamida en solución expresada como % p/v. A medida que el %T aumenta, el tamaño del poro disminuye.

$$\%T = \frac{g \text{ (acrilamida + bisacrilamida)} \times 100}{100 \text{ mL}}$$

El %C es la relación de bisacrilamida con relación a la suma de acrilamida y bisacrilamida. Por encima y por debajo del 5 %, el tamaño del poro aumenta. Es necesario aclarar que el aumento del % de bisacrilamida resulta en un gel más fuerte, lo cual es una ventaja cuando se trabaja con geles de acrilamida de bajo porcentaje

$$\%C = \frac{g \text{ (bisacrilamida)} \times 100}{g \text{ (acrilamida + bisacrilamida)}}$$

Sistema de electroforesis

Según el tipo de sistema utilizado, la electroforesis puede ser continua o discontinua, y la diferencia principal radica en la composición de los *buffers* y el tipo de gel empleados. En la electroforesis continua se utiliza un solo *buffer* con la misma composición y pH tanto en el gel como en la cuba de electroforesis. No presenta una fase de concentración (*stacking*). Las muestras migran directamente desde el pocillo al gel, lo que puede generar bandas más difusas y una resolución menor. Se usa principalmente en separaciones simples o preparativas, donde no se requiere alta definición de bandas.

Por otra parte, en la electroforesis discontinua se utilizan dos *buffers* diferentes (por ejemplo, Tris-HCl a distintos pH) y dos geles con distinta concentración de acrilamida. Se realizan dos geles: un gel concentrador o espaciador o apilador (*stacking gel*) y un gel separador o resolvente. El gel concentrador es de menor pH y concentración (entre 4 – 5 %) por lo que el tamaño del poro es mayor. Esto asegura la migración de todas las proteínas en una misma línea antes de entrar al gel separador.

El gel separador es de mayor pH y concentración de acrilamida (entre 7 – 15 %), donde ocurre la separación de las proteínas. La diferencia de pH y conductividad entre ambas fases provoca un efecto de apilamiento, concentrando las proteínas en una línea muy fina en el gel concentrador antes de ingresar al gel separador. Esto permite obtener bandas nítidas y bien definidas, con alta resolución en la separación según el peso molecular. En este contexto, el sistema SDS-PAGE de Laemmli (Laemmli, 1970) es ampliamente utilizado en análisis de proteínas.

Proceso de SDS-PAGE: tratamiento de las muestras antes de su siembra

Antes de sembrar las muestras en el gel, se mezclan con *buffer* de carga (*Laemmli buffer*). Este *buffer* contiene SDS que desnaturaliza las proteínas, y además puede tener β -

mercaptoetanol o DTT que rompe los puentes disulfuro, glicerol que aumenta la densidad para que la muestra se deposite fácilmente en los pocillos, y azul de bromofenol que actúa como marcador de frente de migración. En algunos casos, la mezcla del *buffer* de carga con la muestra se calienta a 95 °C durante 3 a 5 minutos para desnaturalizar completamente las proteínas.

Proceso de SDS-PAGE: corrida electroforética

Para controlar el pH y la fuerza iónica, durante la electroforesis el gel debe estar saturado con un *buffer*. La corriente del campo eléctrico será conducida por las moléculas de la muestra y por los iones del *buffer* que satura el soporte. El pH de los *buffers* escogidos debe permitir que los compuestos que se deseen separar presenten una carga global positiva o negativa de tal forma que se dirijan hacia el cátodo o ánodo mientras transcurre la electroforesis.

En el sistema clásico de Laemmli, el *buffer* de corrida contiene Tris-HCl, SDS y glicina. El SDS es indispensable para mantener las condiciones de desnaturalización y carga uniforme durante toda la electroforesis. Una molécula de SDS se une cada 2 residuos aminoácidos, por lo que las proteínas adquieren carga neta negativa y una relación carga/masa constante. Esto mantiene la desnaturalización de las proteínas, asegura que migren desplegadas en su conformación lineal e también impide la agregación proteica en el campo eléctrico. Todo ello contribuye a que la separación dependa exclusivamente de la masa molecular, no de la forma ni de la carga intrínseca.

La glicina desempeña un papel esencial para garantizar la correcta resolución de las proteínas durante la electroforesis. Su contribución se basa en los cambios de ionización que experimenta según el pH de cada fase del gel, lo que influye directamente en la distribución del campo eléctrico y en el comportamiento migratorio de las proteínas tratadas con SDS. Durante la corrida, las proteínas ingresan primero al gel apilador, donde el pH reducido ($\approx 6,8$) mantiene a la glicina en una forma mayormente zwitteriónica, con carga neta cercana a cero. En estas condiciones, la glicina se comporta como un ion móvil lento, mientras que el cloruro procedente del Tris-HCl del gel actúa como ion rápido. Esta diferencia de movilidad iónica genera una discontinuidad en la conductividad del sistema, produciendo un espacio de bajo voltaje en el que las proteínas, uniformemente cargadas por el SDS, quedan confinadas y se agrupan en una banda estrecha. Este proceso, denominado apilamiento, aumenta significativamente la nitidez inicial de las muestras.

Cuando la corriente alcanza el gel separador, cuyo pH es más alcalino ($\approx 8,8$), la glicina adquiere una mayor ionización negativa y su movilidad aumenta de forma abrupta. Este cambio elimina la discontinuidad iónica que caracterizaba al gel apilador, lo que disipa el efecto de apilamiento. A partir de este punto, las proteínas migran según su tamaño, desplazándose a través de la matriz de poliacrilamida con una resolución definida.

De esta manera, la glicina cumple la función crítica de modular el campo eléctrico a lo largo del gel, permitiendo que la separación electroforética se inicie con un apilamiento eficiente y continúe con una migración diferenciada por peso molecular. Sin su presencia y comportamiento diferencial en cada región del gel, no sería posible alcanzar la alta resolución que caracteriza al SDS-PAGE.

En estas condiciones desnaturalizantes, la movilidad electroforética es inversamente proporcional al tamaño de la proteína, de forma que se puede establecer una correlación negativa entre el logaritmo de la masa molecular de la proteína o péptido y su R_f (coeficiente de movilidad relativa). La movilidad de cualquier especie molecular puede determinarse por su R_f , que es el resultado de dividir el recorrido de la especie molecular por el recorrido del frente electroforético. De esta forma, se puede calcular la masa molecular de diferentes proteínas cuando se dispone de patrones de tamaño conocido que son separados en la misma electroforesis.

Equipo electroforético

La técnica de PAGE requiere un conjunto de instrumentos y materiales diseñados para permitir la polimerización del gel, la carga de muestras y la migración eléctrica controlada de las proteínas. El correcto armado y uso del equipo es esencial para obtener resultados reproducibles y seguros en el laboratorio. Los elementos y su función se detallan en la **Figura 5.24**. Además de los componentes que se mencionan en esta figura, se debe mencionar a los geles de poliacrilamida y el *buffer* de corrida o *buffer* de electroforesis, solución conductora que se coloca en la cuba. Este *buffer*, compuesto por Tris-Glicina-SDS, mantiene el pH y la conductividad durante el proceso. También se debe añadir los recipientes y cubetas donde se tratarán los geles luego de la corrida electroforética, cubetas para fijar, teñir geles para visualizar las bandas.



Figura 5.24. Sistema electroforético. 1. **Sistema de placas de vidrios:** consta de dos placas de vidrio, una más corta y otra más larga, entre las cuales se prepara el gel de poliacrilamida. Se sellan con separadores de goma o teflón para evitar fugas durante el vertido del gel. El vidrio más largo tiene separadores, tiras de material plástico o de goma que determinan el espesor del gel (de 0,75 a 1,5 mm). 2. **Peine (verde):** se inserta durante la polimerización del gel apilador para formar los pocillos donde se depositarán las muestras. 3. **Celda de electroforesis:** dispositivo principal que sostiene las placas de gel. Tiene dos compartimientos, superior (cátodo) e inferior (ánodo), conectados por el gel. En cada uno se coloca el tampón de corrida. 4. **Cuba electroforética:** contiene el sistema gel–buffer–electrodos y proporcionar un campo eléctrico uniforme que permita la separación de moléculas cargadas de manera precisa, segura y reproducible. 5. **Bandeja de carga:** sostiene cuando se carga el gel. 6. **Fuente de poder:** genera el campo eléctrico que impulsa el movimiento de las proteínas a través del gel. Permite ajustar el voltaje y la intensidad de la corriente durante la corrida.

Proceso de SDS-PAGE: fijación y tinción de proteínas en geles de poliacrilamida

Una vez finalizada la electroforesis, las proteínas separadas en el gel de poliacrilamida no son visibles a simple vista. Por ello, es necesario realizar un proceso de fijación y tinción, que permite inmovilizar las proteínas en el gel y conservar la integridad del patrón obtenido y visualizar las bandas proteicas mediante un colorante.

El objetivo de la fijación de los geles es detener la migración electroforética, eliminar el detergente (SDS) y las sales, e inmovilizar las proteínas dentro de la matriz del gel para evitar su difusión. Para ello, se retira cuidadosamente el gel del sistema de electroforesis y se lo coloca en una bandeja o recipiente con solución fijadora, que comúnmente contiene metanol (40–50 %), ácido acético glacial (10 %) y agua destilada (hasta completar el volumen). Se incuba el gel en esta solución por 30 a 60 minutos con agitación suave, pudiendo cambiar la solución de fijación para mejorar la eliminación del SDS. Como resultado, las proteínas quedan fijas en la matriz del gel, listas para ser teñidas.

La tinción del gel permite visualizar las bandas proteicas mediante un colorante que se une selectivamente a las proteínas. Los métodos más comunes son la tinción con azul de Coomassie Brilliant Blue R-250 o G-250 y la tinción con plata (*silver staining*) (**Figura 5.25**). En el método del Coomassie Brilliant Blue R-250 o G-250, el gel fijado se sumerge en la solución de tinción, compuesta por Coomassie Brilliant Blue R-250 o G-250 0,1 % (p/v), metanol 40–50 % y ácido acético glacial 10 %. Se incuba por una o dos horas con agitación constante hasta que el gel se tiñe completamente. Como resultado, el colorante se une a las proteínas mediante interacciones

hidrofóbicas y fuerzas electrostáticas. Luego de la tinción, es necesario realizar un paso de decoloración para remover el exceso de colorante no unido al gel, dejando únicamente las bandas correspondientes a las proteínas. El gel se puede lavar varias veces con solución de decoloración (metanol 40 % y ácido acético 10 %) o con otro *buffer* hasta que el fondo del gel quede transparente y las bandas proteicas nítidas y bien definidas (**Figura 5.25a**). La sensibilidad de este método de tinción es menor a la de la plata; se puede detectar como mínimo 0,1 μg de proteína aproximadamente.

El método de tinción con sales de plata se basa en la unión del nitrato de plata a los grupos funcionales (sulfhidrilos, carboxilos y aminos) de las proteínas. Durante el proceso de revelado con una solución reductora como el formaldehído en carbonato de sodio, los iones de plata se reducen a plata metálica, generando bandas oscuras visibles sobre un fondo transparente (**Figura 5.25b**). Este proceso se detiene con ácido acético diluido. Con la tinción con plata se puede detectar como mínimo 1 ng de proteína; es 100 veces más sensible que el método del Coomassie. Sin embargo, este método de tinción es más laborioso porque implica varios pasos de sensibilización, impregnación con nitrato de plata y revelado con formaldehído. Por este motivo, se lo utiliza cuando la cantidad de proteína es baja.

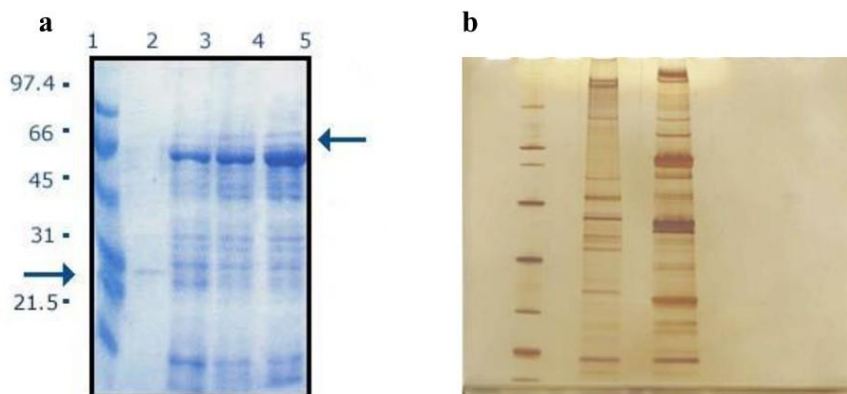


Figura 5.25. Geles teñidos con los métodos más comunes. a. Gel teñido con azul de Coomassie Brilliant Blue R-250 o G-250. La sensibilidad de este método es de 0,1 μg de proteínas. b. Gel teñido con sales de plata. La sensibilidad de este método es de 1 ng de proteínas.

Proceso de SDS-PAGE: interpretación de resultados mediante el cálculo del Rf

Para cuantificar la migración de las proteínas en el gel, se utiliza el factor de retardo o Rf (*Relative front*). El análisis del Rf es una herramienta sencilla y poderosa para interpretar los resultados de electroforesis, vinculando la movilidad con el tamaño de las proteínas y facilitando su identificación y comparación experimental. El Rf es un valor adimensional que permite comparar la movilidad de las proteínas en distintos geles o corridas y se calcula:

$$Rf = \frac{\text{Distancia migrada por la proteína}}{\text{Distancia migrada por el frente del colorante}}$$

Donde la distancia migrada por la proteína significa la longitud desde el pocillo de carga hasta el centro de la banda; y la distancia migrada por el frente del colorante significa la longitud desde el pocillo hasta la línea final del marcador de corrida. Los Rf bajo, cercanos a 0, representan proteínas de mayor tamaño molecular, que migran lentamente a través del gel. Los Rf altos, cercanos a 1, representan proteínas más pequeñas, que se desplazan más rápidamente hacia el extremo positivo.

Aplicando el cálculo del Rf y utilizando la masa relativa de los pesos moleculares conocidos del patrón de proteínas, se construye una curva de calibración ($\log M_r$ vs. Rf) que sirve para interpolar el peso molecular de proteínas desconocidas (**Figura 5.26**). Además, permite verificar similitudes o diferencias en los perfiles proteicos e identificar la presencia o ausencia de una proteína de interés.

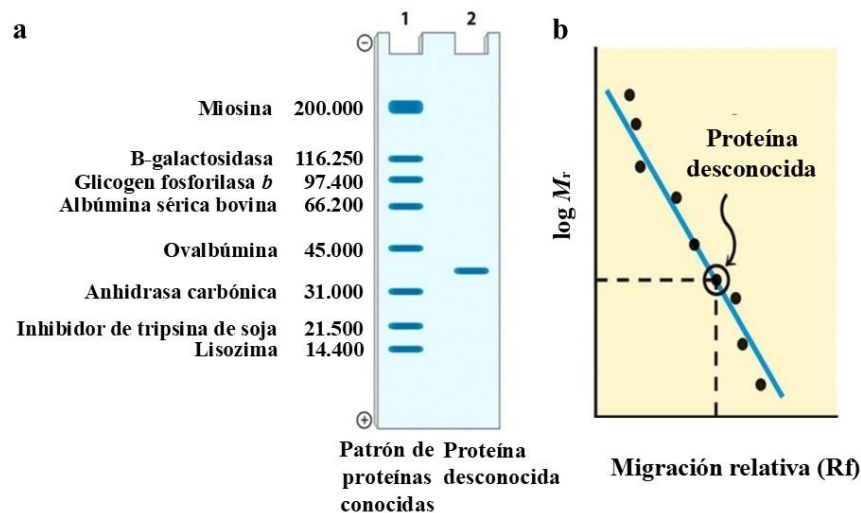


Figura 5.26. Cálculo del Rf. a. Esquema de un gel teñido con azul de Coomassie Brilliant, en la calle 1 se representa un marcador molecular de patrón de proteínas conocidas; en la calle 2 se representa una proteína con peso molecular desconocido. b. Curva de calibración construida por el peso molecular de las proteínas conocidas del patrón y la migración relativa (Rf) de estas.

Consideraciones de seguridad al trabajar con poliacrilamida

La poliacrilamida en solución no polimerizada constituye un agente neurotóxico y debe manipularse con extremo cuidado. Los monómeros de acrilamida y bis-acrilamida, que suelen adquirirse en forma de polvo, pueden liberar partículas finas fácilmente inhalables; por ello, durante su pesada es imprescindible el uso de barbijo o mascarilla con filtro adecuado, además de guantes y protección ocular.

Una vez completada la polimerización, el gel resultante no representa un riesgo significativo; sin embargo, es frecuente que queden pequeñas fracciones de solución sin polimerizar, ya que el proceso no ocurre en presencia de oxígeno. Por esta razón, se recomienda no retirar los guantes al manipular los geles recién preparados ni al limpiar el área de trabajo. Además, todos los materiales que entren en contacto con la acrilamida, papeles absorbentes, puntas de pipeta, tubos o utensilios plásticos, deben considerarse residuos tóxicos de alto riesgo y descartarse conforme a las normas de bioseguridad y protocolos institucionales de manejo de residuos químicos peligrosos.

FUNDAMENTO TEÓRICO DEL WESTERN BLOT

La técnica de Western blot o inmunoblot es una técnica utilizada para detectar proteínas específicas dentro de una mezcla compleja, combinando la separación electroforética con la identificación inmunológica (detección específica mediante anticuerpos). Se trata de una técnica altamente específica y sensible que se aplica para confirmar la presencia, tamaño y nivel de expresión de proteínas particulares en distintos tejidos o condiciones experimentales. Es una técnica laboriosa e involucra varias etapas.

Etapas de Western blot: separación electroforética de las proteínas

Las proteínas de la muestra se separan en un gel de poliacrilamida bajo condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), de acuerdo con su peso molecular, se utiliza un marcador de peso molecular para determinar la proteína a estudiar.

Etapas de Western blot: transferencia a membrana

Luego de la electroforesis, las proteínas se transfieren desde el gel a una membrana sólida que permita su posterior detección mediante anticuerpos. Estas membranas pueden ser de nitrocelulosa o fluoruro de polivinilideno (PVDF), materiales que presentan alta afinidad por las proteínas y una superficie uniforme que facilita la unión estable y la visualización de las bandas).

El proceso se basa en el uso de una corriente eléctrica que impulsa las proteínas cargadas negativamente (por el SDS) a migrar desde el gel hacia la membrana, donde quedan adsorbidas en la misma disposición en que se encontraban en el gel. La transferencia se realiza en un sistema húmedo (cuba de *blot*) o semiseco, utilizando un buffer de transferencia que contiene Tris, glicina y metanol, componentes que facilitan la movilidad de las proteínas y su fijación a la membrana.

Metodológicamente, se prepara un dispositivo para la transferencia denominado “sándwich de transferencia” debido a que se colocan varias capas alineadas para evitar distorsiones en las bandas: esponjas - papeles de filtro - gel - membrana - papeles de filtro – esponjas (**Figura 5.27**). Se debe tener en cuenta eliminar burbujas de aire entre el gel y la membrana ya que interfieren con la transferencia. Luego, se sumerge en el *buffer* de transferencia y se conecta la corriente eléctrica (100 V durante el tiempo necesario para realizar la transferencia). Se puede verificar la eficiencia de la transferencia, por ejemplo, tiñendo la membrana con Ponceau S, lo que permite observar las bandas transferidas. Así también como el uso de marcadores de pesos moleculares marcados con colorantes, donde cada banda se puede visualizar a simple vista.

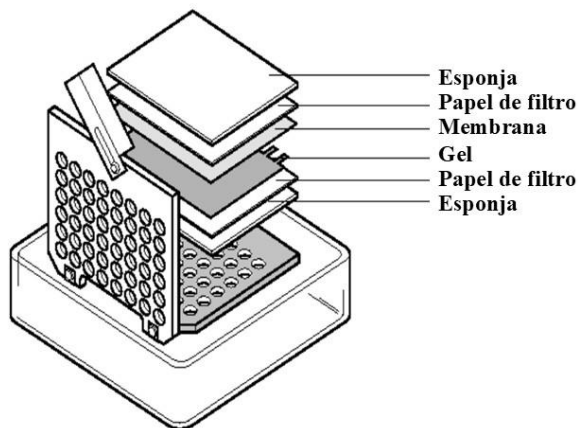


Figura 5.27. Esquema del sándwich de transferencia. Dispositivo por el cual se lleva a cabo la transferencia de las proteínas desde el gel (luego de la electroforesis) a la membrana para llevar a cabo las siguientes etapas del *western blot*.

Etapas de Western blot: bloqueo de sitios inespecíficos

El bloqueo es una etapa fundamental del Western blot; se realiza inmediatamente después de la transferencia de las proteínas a la membrana. Su propósito es evitar la unión inespecífica de los anticuerpos a zonas de la membrana que no contienen proteínas, lo cual podría generar fondo o señales falsas durante la detección debido a que las membranas de nitrocelulosa o PVDF poseen una alta afinidad por las proteínas, pudiendo atraer anticuerpos de manera no específica.

El bloqueo consiste en cubrir los sitios libres de la superficie con una solución de proteínas inertes, que actúan como barrera física evitando la unión inespecífica de anticuerpos. Para ello, la membrana se incuba con una solución bloqueante; las más comunes son la leche descremada 3-5 % en *buffer* TBS-T o PBS-T que contienen caseína que satura eficazmente los sitios libres o la albúmina sérica bovina para saturar los sitios libres, u otros bloqueadores comerciales específicos formulados para reducir el fondo en detecciones quimioluminiscentes o

fluorescentes. El tipo de bloqueante elegido depende de la naturaleza del anticuerpo y el método de detección, teniendo en cuenta que un bloqueo insuficiente puede causar bandas difusas o fondo alto, mientras que un bloqueo excesivo puede disminuir la sensibilidad del ensayo.

Metodológicamente, la membrana con las proteínas transferidas se incuba por 30 minutos a 1 hora a temperatura ambiente o toda la noche a 4 °C, según el protocolo. Luego, se lava con *buffer* TBS-T o PBS-T para eliminar el exceso de bloqueante antes de agregar el anticuerpo primario.

Etapas de Western blot: incubación con el anticuerpo primario

Generalmente, la detección se realiza en dos etapas: un anticuerpo primario reconoce específicamente la proteína de interés y un anticuerpo secundario conjugado con una enzima o un fluoróforo permite su visualización. Dependiendo del método utilizado, la señal puede detectarse por quimioluminiscencia, fluorescencia o colorimetría.

La incubación con el anticuerpo primario constituye una de las etapas más críticas del Western blot, ya que determina la especificidad de la detección, asegurando que la señal obtenida corresponda exclusivamente a la proteína de interés. En este paso, el anticuerpo se une de forma selectiva a la proteína de interés inmovilizada sobre la membrana, permitiendo su posterior visualización mediante el anticuerpo secundario.

El anticuerpo primario, habitualmente de origen monoclonal o policlonal, reconoce un epítipo (o epítipo) específico, una pequeña región o secuencia de aminoácidos de la proteína blanco (**Figura 5.28**). Esta unión altamente específica es la base del método inmunológico que diferencia al Western blot de otra tinción proteica.

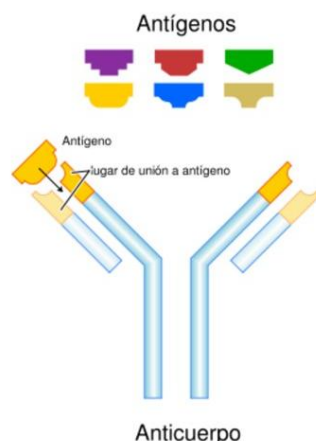


Figura 5.28. Esquema de un anticuerpo-antígeno. Los anticuerpos son proteínas producidas en los vertebrados en respuesta a la exposición con estructuras extrañas denominadas antígenos.

La membrana se coloca en una solución del anticuerpo primario diluido en *buffer* con agente bloqueante (por ejemplo, TBS-T y 1 % de leche o BSA). Las condiciones de incubación

dependen del anticuerpo. Generalmente se utiliza una dilución entre 1:500 y 1:5000, según la afinidad del anticuerpo, cuidando de no usar una dilución incorrecta, ya que puede generar fondo alto si el anticuerpo está concentrado o pérdida de señal si el anticuerpo está diluido. El tiempo de incubación puede variar entre 1 h a temperatura ambiente y toda la noche a 4 °C para mayor sensibilidad, bajo agitación suave y continua, lo que asegura el contacto uniforme. Luego, el anticuerpo se retira con lavados sucesivos con *buffer* (TBS-T o PBS-T) para eliminar el exceso no unido.

Puede suceder que el anticuerpo primario se encuentre conjugado con moléculas fluorescentes o enzimas y no se necesite usar anticuerpos secundarios (**Figura 5.29a**). Esta es una técnica de inmunodetección directa y tiene las ventajas de que conlleva menos pasos y menos problemas de ruido de fondo (*background*) y es posible la doble marcación. Sin embargo, tiene las desventajas de tener una menor sensibilidad y una señal poco amplificada. Por otra parte, en la técnica indirecta se usa un anticuerpo primario no marcado y un segundo anticuerpo conjugado (marcado) dirigido contra el anticuerpo primario (**Figura 5.29b**). En esta técnica, los anticuerpos conjugados pueden usarse en varios tipos de reacciones ya que la especificidad está dada por el anticuerpo primario. Sin embargo, es una técnica que conlleva más pasos y si se desea detectar antígenos múltiples, se necesitan anticuerpos primarios de diferentes especies.

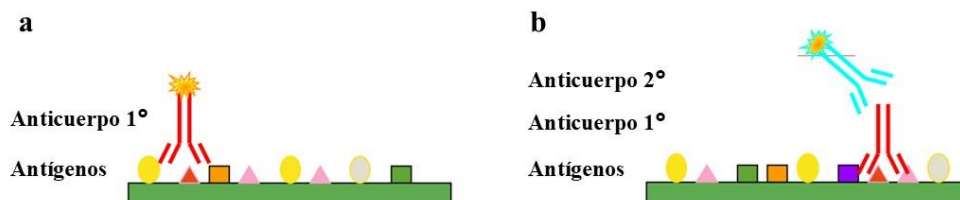


Figura 5.29. Esquema de anticuerpo-antígeno. a. Detección directa, el anticuerpo primario está conjugado a moléculas fluorescentes o enzimas, no se usa anticuerpos secundarios. **b. Detección indirecta**, se usa un anticuerpo primario no marcado y un segundo anticuerpo marcado dirigido contra el anticuerpo primario.

Etapas de Western blot: incubación con el anticuerpo secundario

La incubación con el anticuerpo secundario es el paso que transforma la unión específica del anticuerpo primario en una señal detectable, permitiendo la identificación precisa y sensible de las proteínas en el Western blot. Se aplica un anticuerpo secundario que se une específicamente al anticuerpo primario que reconoció previamente la proteína blanco.

El anticuerpo secundario está diseñado para reconocer la región constante (Fc) del anticuerpo primario. Por ejemplo, si el anticuerpo primario es de ratón, el secundario será un

antirratón. Los anticuerpos secundarios están conjugados con una enzima o marcador que permite visualizar la unión. Los más comunes son la peroxidasa de rábano (HRP), la cual se detecta por quimioluminiscencia o cromogénesis; la fosfatasa alcalina (AP), la cual se detecta por cromogénesis; o fluorocromos, detectados por fluorescencia. Además, se pueden usar anticuerpos policlonales o monoclonales. Los primeros son mezclas de anticuerpos que reconocen múltiples epítopos del anticuerpo primario, lo que significa mayor sensibilidad; en contraste con los anticuerpos monoclonales que reconocen un único epítipo con mayor especificidad y menor ruido de fondo.

El anticuerpo secundario se diluye en el *buffer* bloqueante según la recomendación del fabricante; las diluciones más comunes son entre 1:2.000 y 1:10.000. Luego de la incubación, se debe eliminar cualquier anticuerpo no unido con lavados repetidos con *buffer* TBS-T o PBS-T para reducir el fondo inespecífico.

Al finalizar esta etapa, la membrana contiene los complejos proteína–anticuerpo primario–anticuerpo secundario marcado, listos para ser revelados mediante la adición del sustrato apropiado, generando una señal visible o luminosa proporcional a la cantidad de proteína presente.

Etapas de Western blot: detección

La detección es el momento en que el Western blot transforma la unión molecular invisible entre anticuerpos y proteínas en una imagen concreta, revelando la presencia, tamaño y abundancia de la proteína estudiada. (si se cuantificó previamente y se siembra la misma cantidad de proteína total). El anticuerpo secundario suele estar conjugado a una enzima o molécula que permite visualizar la unión antígeno-anticuerpo. Existen diferentes tipos según el método de detección:

- Conjugados enzimáticos: el más común es la *Horseradish Peroxidase* (HRP), una enzima con alta sensibilidad y rápida reacción frente a sustratos quimioluminiscentes o colorimétricos en presencia de peróxido de hidrógeno. Se usa ampliamente en técnicas inmunológicas como ELISA, Western blot o inmunohistoquímica por su alta sensibilidad y rápida reacción. Por su parte, la *Alkaline Phosphatase* (AP) es una enzima que hidroliza grupos fosfato en condiciones alcalinas. Es más estable que la HRP, lo que la hace conveniente para detecciones prolongadas; su actividad se revela mediante sustratos cromogénicos. En ambos casos, al añadirse el sustrato específico, la enzima

cataliza una reacción química que genera un compuesto coloreado o luminoso. Este método es simple, económico e ideal para la observación directa.

- Conjugados fluorescentes: acoplados a fluorocromos que emiten luz a diferentes longitudes de onda. Este método permite la detección múltiple de varias proteínas simultáneamente, usando equipos de escaneo por fluorescencia.
- Conjugados biotinilados: en este sistema, el anticuerpo secundario se une a biotina, y luego se detecta con estreptavidina conjugada a HRP o fluoróforo. Ofrece mayor amplificación de señal, aunque el procedimiento es más largo.

Cualquiera de los métodos produce un compuesto coloreado o luminoso cuya intensidad es proporcional a la cantidad de proteína presente. Se debe evitar una exposición excesiva que pueda saturar la señal.

TALLER n.º 4: ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

Contenidos a desarrollar

- Método colorimétrico de Bradford para la determinación de la concentración proteica.
- Principios teóricos de las técnicas básicas de aislamiento y separación de proteínas como SDS-PAGE.
- Principios teóricos del Western blot y el uso de anticuerpos específicos en la detección inmunológica de proteínas.
- Interpretación de esquemas y resultados de electroforesis y transferencia de proteínas.

Plan de actividades: método de Bradford

Resuelvan las siguientes actividades:

1. ¿Qué formas de cuantificación de proteínas conoce? Explique las distintas aplicaciones que tendría cada método.

2. Para la determinación de la concentración de proteínas por el método de Bradford, se confeccionó una curva de calibración utilizando una solución patrón de 1 mg/mL de albúmina sérica bovina (BSA) de acuerdo con la tabla que se muestra más abajo (**Tabla 5.1**).

Tabla 5.1. Reactivos para realizar la curva patrón de albúmina para el método de Bradford.

| Agua (µL) | BSA (µL) | Bradford |
|-----------|----------|----------|
| 798,8 | 1,2 | 750 |
| 797,5 | 2,5 | 750 |
| 795 | 5 | 750 |
| 790 | 10 | 750 |

3. Con los datos de la **Tabla 5.2** realice un gráfico cuyos ejes coordenados sean A_{595} vs. µg de BSA en el tubo de colorimetría (dos primeras columnas de la tabla, respectivamente). A partir del gráfico interpolar las concentraciones (cuarta columna de la tabla) y completar la tabla (quinta columna de la tabla).

Tabla 5.2. Absorbancias medidas en espectrofotómetro

| Concentración BSA ($\mu\text{g/mL}$) | Absorbancia (595 nm) | n.º de muestra | Absorbancias de las muestras | Concentraciones de las muestras ($\mu\text{g/mL}$) |
|--|----------------------|----------------|------------------------------|--|
| Blanco | 0,667 | 1 | 0,88 | |
| Blanco | 0,746 | 2 | 0,718 | |
| Blanco | 0,747 | 3 | 0,92 | |
| 1,2 $\mu\text{g/mL}$ | 0,794 | 4 | 0,339 | |
| 1,2 $\mu\text{g/mL}$ | 0,696 | 5 | 0,408 | |
| 1,2 $\mu\text{g/mL}$ | 0,784 | 6 | 0,297 | |
| 2,5 $\mu\text{g/mL}$ | 0,741 | 7 | 0,58 | |
| 2,5 $\mu\text{g/mL}$ | 0,749 | 8 | 0,643 | |
| 2,5 $\mu\text{g/mL}$ | 0,834 | 9 | 0,793 | |
| 5 $\mu\text{g/mL}$ | 0,958 | 10 | 0,364 | |
| 5 $\mu\text{g/mL}$ | 0,932 | 11 | 0,457 | |
| 5 $\mu\text{g/mL}$ | 0,905 | 12 | 0,407 | |
| 10 $\mu\text{g/mL}$ | 1,117 | 13 | 0,813 | |
| 10 $\mu\text{g/mL}$ | 1,19 | 14 | 0,785 | |
| 10 $\mu\text{g/mL}$ | 1,1 | 15 | 0,796 | |

Las mediciones de la curva de calibración y de las muestras se realizaron por triplicado.

- ¿Cuál es el fundamento de la colorimetría de Bradford para la determinación de proteínas? Compare la sensibilidad de este método con la técnica de Lowry.

Plan de actividades: electroforesis en geles de poliacrilamida

- ¿Qué es una electroforesis? ¿Cuáles conoce?
- ¿Cuáles son las ventajas de los geles de poliacrilamida?
- ¿Qué sucede con las proteínas a un pH alcalino y a un pH ácido? ¿Cómo se utilizan estas propiedades en las distintas electroforesis de proteínas?
- ¿Qué tipo de geles son los de poliacrilamida y de qué depende el tamaño del poro?
- ¿Cómo comienza la polimerización en geles de poliacrilamida? ¿Qué función cumple el APS y el TEMED?
- ¿Qué tipo de buffer se encuentra en las electroforesis discontinuas? ¿Por qué se los utiliza?
- ¿Para qué sirven las electroforesis no desnaturizantes? ¿Qué desventajas tienen?

12. Observen los siguientes SDS-PAGE (**Figura 5.30**) y teniendo en cuenta el fundamento de estos, ¿qué conclusiones pueden sacar de su interpretación?
13. Grafiquen a partir del gel teñido con nitrato de plata el peso molecular (M) de las proteínas del estándar vs. el factor de migración (Rf). Utilizando su gráfico, determinen el peso molecular de la enzima marcada con la flecha.

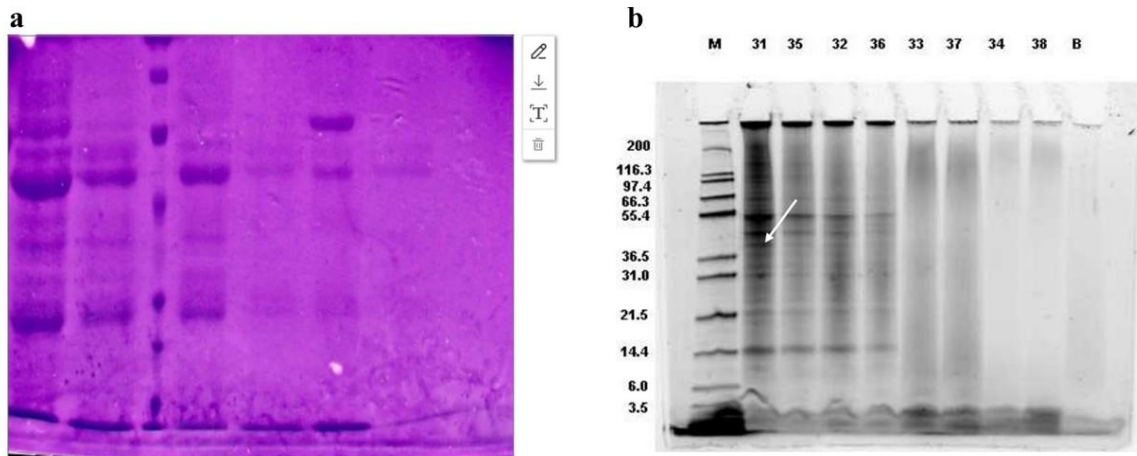


Figura 5.30. a) Gel SDS-PAGE. b) Gel SDS-PAGE teñido con nitrato de plata. M: peso molecular de las proteínas del estándar. Flecha blanca: señala la enzima en el gel que debe ser analizada según su peso molecular.

14. ¿Con qué otro reactivo se puede teñir el SDS-PAGE y qué criterios utilizarían a la hora de elegirlo?
15. ¿Cuál es la función del β -mercaptoetanol y del SDS?
16. ¿Cuál es el propósito de hervir la muestra antes de la corrida en los geles SDS-PAGE?
17. Analicen una mezcla de proteínas: la proteína A es dimérica con subunidades de 25 kDa y 55 kDa, y la otra proteína B es dimérica con subunidades idénticas de 35 kDa. Realicen un gráfico de los perfiles de corrida que espera encontrar si hace una corrida en gel SDS-PAGE con y sin β -mercaptoetanol, y una corrida en gel PAGE no desnaturizante.
18. ¿Qué tipos de geles para electroforesis conoce y en qué se diferencian?
19. Dibujen esquemáticamente un gel de electroforesis discontinua, indicando los pH y la función de la glicina.
20. ¿Cuál es la función del gel concentrador y del separador?

Resuelva las siguientes situaciones problemáticas:

- a- Un virus contiene 256 proteínas, de las cuales 64 tienen una masa molecular de 1.800 y las 192 restantes tienen una masa molecular de 26.000. Se disocia por completo el virus y se analizan sus componentes por electroforesis SDS-PAGE. Dibuje un esquema del resultado esperado, indicando la posición e identidad de las bandas proteicas y su intensidad relativa.

b- Se ha determinado la movilidad relativa de la lactato-deshidrogenasa (LDH) y de varias proteínas patrón en electroforesis en gel de poliacrilamida al 7,5 % en presencia de SDS, obteniéndose los valores de la **Tabla 5.3**. Calcule la masa molecular estimada de la LDH.

Tabla 5.3. Masa molecular y movilidad relativa de proteínas patrón. Movilidad relativa de la LDH.

| Muestra | | Patrones | | | | | |
|-----------------------------------|-------|-------------------|----------|-----------------------------|---------------------------------------|----------|-----------------|
| Proteína | LDH | Sero- albúmina | Catalasa | Glutamato deshidrogenasa | Gliceraldehído-3- P-deshidrogenasa | Tripsina | Mio- globina |
| M_r (kDa) | ¿? | 68 | 60 | 53 | 36 | 23,3 | 17,2 |
| Movilidad (relativa al frente) | 0,455 | 0,18 | 0,22 | 0,29 | 0,40 | 0,60 | 0,74 |

LDH: lactato-deshidrogenasa

c- Se quiere separar una mezcla de las hemoglobinas HbA, HbS y HbC. Sabiendo que donde la hemoglobina normal adulta, HbA, tiene un residuo de Glu la HbS tiene Val y la HbC tiene Lys, razonen qué medio utilizaría para realizar la electroforesis en gel: un *buffer* borato de pH=3.5 o un *buffer* carbonato de pH=8.5. Dibujen un esquema con la posición de las bandas resultantes.

d- Una proteína en su estado nativo tiene un peso molecular de 115 kDa. En función de los resultados de los geles de poliacrilamida donde sembró la proteína pura pretratada con tres tratamientos (**Figura 5.31**), deduzcan su estructura cuaternaria (número de subunidades, PM de cada una de ellas, uniones que las estabilizan y glicosilación de subunidades)

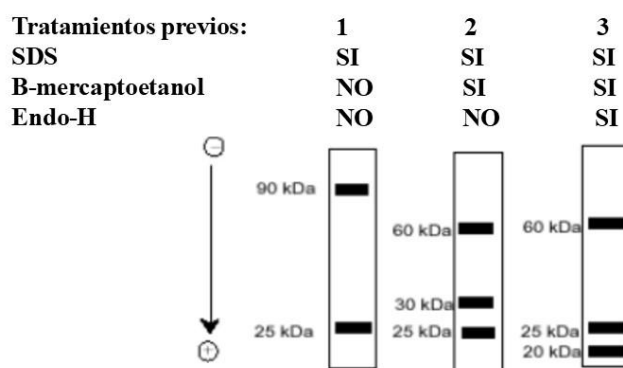


Figura 5.31. Esquema de los geles de una proteína de 115.000 kDa sometida a tres diferentes pretratamientos. La endo-H corta la unión proteína-azúcar.

Al final de la corrida electroforética, los geles fueron teñidos con Coomassie Blue, la sensibilidad del Coomassie Blue es tal que es capaz de detectar a partir de aproximadamente 0,2 μ g de proteína/banda. ¿Creen que es correcto afirmar que una proteína está pura si el resultado es una sola banda en un gel teñido con ese colorante?

Plan de actividades: Western blot

Resuelva el siguiente cuestionario:

1. ¿Cuáles son los objetivos y las utilidades de realizar la técnica Western blot? Comenten ejemplos.
2. ¿Cómo se realiza un sándwich y en qué posición debe quedar el gel con respecto a la membrana? ¿Por qué las proteínas se unen a la membrana? ¿Qué tipo de membranas conoce? ¿Cuáles son las características principales que deben poseer?
3. ¿Cuáles son los controles que se pueden utilizar para saber que la transferencia se realizó correctamente?
4. ¿Por qué se bloquea la membrana? ¿Por qué se utiliza leche descremada al 5 %? ¿Para qué es importante lavar la membrana luego de bloquearla?
5. En una tinción indirecta, ¿qué reconoce el anticuerpo primario y qué el secundario?
6. ¿Por qué es importante lavar la membrana luego del reconocimiento del anticuerpo primario y secundario?
7. ¿Cuáles son los métodos de detección y revelado que conoce?

Resuelva las siguientes situaciones problemáticas:

- a. Teniendo en cuenta que en distintas investigaciones se ha encontrado que la SHP-1 asociada con el SSTR2 depende de él para su activación. En la **Figura 5.32** se observa la expresión de la fosfotirosina fosfatasa 1 (SHP-1) y del receptor de somatostatina subtipo 2 (SSTR2) en una línea celular de cáncer de tiroides medular. Las células han sido tratadas con un medio control el cual poseía una concentración de somatostatina (SRIF) a la cual se inhibe marcadamente la proliferación de esta línea celular o con un inhibidor de fosfotirosinas fosfatasas (PTP). Observen el tamaño de la banda en cada caso y recuerden que esta técnica es cuantitativa. Indiquen la cantidad de las proteínas en cada carril, ¿esto dependerá de lo que contenga el medio?

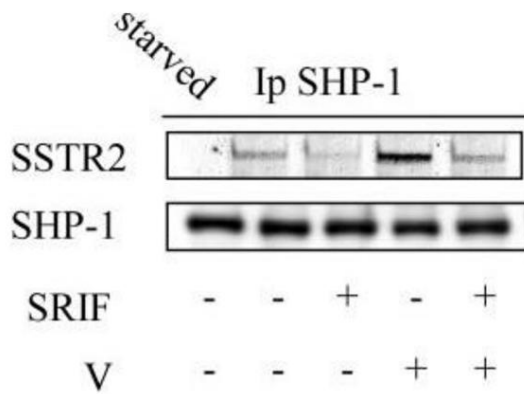


Figura 5.32. Análisis de western blot para SSTR2 y SHP-1 sobre extractos de proteínas derivado desde células TT incubadas con o sin 10^{-8} M de somatostatina (SRIF), 10^{-5} M del inhibidor de PTP (V), o ambos. Starved se refiere a las células que no fueron incubadas con un medio control. Tomado de *Endocrinology* 146: 2692–2698, 2005. SSTR2: receptor de somatostatina subtipo 2; SHP-1: fosfatasa 1.

Actividad propuesta para la práctica docente.

Se propone como actividad complementaria a la práctica para sus futuros estudiantes trabajar con el simulador Biomodel, <https://biomodel.uah.es/lab/SDS-PAGE/>. En este simulador encontrarán una aplicación interactiva que les permitirá simular el proceso de electroforesis de las proteínas en un gel de poliacrilamida con SDS. Tras la separación, se puede obtener un gráfico con los resultados, donde se determina la masa molecular experimental de las muestras a partir de su movilidad comparada con la de los patrones. Además de pensarse como una actividad complementaria para los estudiantes, también puede pensarse como un recurso único en el caso de que los futuros docentes no cuenten con laboratorios preparados para llevar a cabo este tipo de técnicas.

TRABAJO PRÁCTICO n.º 4: ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

Cuantificación de proteínas por el método de Bradford

Equipamiento y materiales

- Microtubos nuevos de 1,5 o 2 mL
- Micropipetas
- Puntas azules y amarillas nuevas
- Espectrofotómetro luz visible

Reactivo

- Reactivo de Bradford

Procedimiento

Medición de las absorbancias de las muestras

1. Para preparar las muestras, en un microtubo agregar 750 μL del reactivo de Bradford y 25 μL de la muestra.
2. Para preparar el blanco reactivo, en un microtubo agregar 750 μL del reactivo de Bradford y 25 μL de agua destilada.
3. Agitar todos los microtubos en vórtex.
4. Dejar en reposo los microtubos por 5 minutos a resguardo de la luz (se puede medir dentro de la primera hora de reacción).
5. Leer a 595 nm. Luego de leer el Blanco reactivo, autocero. Las demás muestras se continúan midiendo normalmente.

Nota: para absorbancia mayor a 1, diluir en agua destilada y corregir en el cálculo con el factor de dilución utilizado.

Cálculo de la concentración de proteínas

Utilizar la ecuación de la curva patrón. Para construir la curva, se determinaron las absorbancias de 7 concentraciones conocidas (puntos de la curva) del patrón (albúmina) y se realizó un gráfico de dispersión en Excel (**Figura 5.33**).

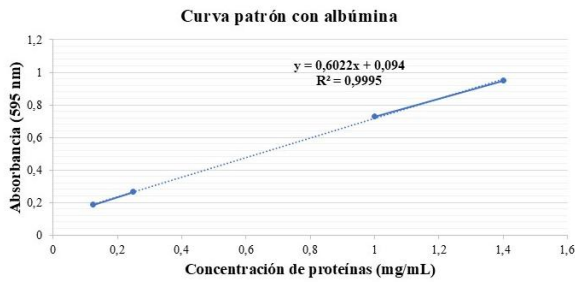


Figura 5.33. Curva patrón de albúmina. La ecuación de la curva se utiliza para interpolar los valores de absorbancia de las muestras proteicas de concentración desconocida.

Ecuación de la recta:

$$y = a \cdot x + b$$

donde **y** es la absorbancia y **x** la concentración de proteínas (mg/mL).

Se despeja **x**:

$$\text{Concentración de proteínas totales (mg/mL)} = (y - b)/a$$

Se reemplaza **y** por la absorbancia de la muestra medida en el espectrofotómetro.

Ejemplo: con la ecuación de la recta: $y = 0,6022x + 0,094$ (con $R^2 = 0,9995$); una lectura de absorbancia = 0,104:

$$\text{Concentración de proteínas totales (mg/mL)} = (0,104 - 0,094)/0,6022$$

La concentración proteica de 0,016 mg/mL.

En $\mu\text{g/mL}$, tengo: 16 $\mu\text{g/mL}$

SDS-PAGE

Equipamiento y materiales

- Fuente de poder
- Cuba para electroforesis vertical
- Vasos de precipitado para preparar las soluciones de los geles
- Balanza analítica
- Agitador (shaker)
- Probetas
- Cubas o *tuppers* para fijar y teñir los geles
- Micropipetas automáticas
- Puntas (“tips”) azules, amarillas y “pico de pato”

Preparación de las soluciones de trabajo

- Solución stock de acrilamida-bisacrilamida 50 % (29:1):

Acrilamida 48,3 g

Bisacrilamida 1,7 g

Agua destilada c.s.p. 100 mL

Conservar a 4 °C y protegida de la luz.

- APS 10 % (p/v):

APS 10 mg

Agua destilada 100 µL

Preparar y utilizar en el momento.

- *Buffer* del gel separador. Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8:

Pesar 18.16 g de Tris y disolverlo en 100 mL de agua destilada. Ajustar el pH a 8,8 con HCl concentrado.

Conservar a 4 °C.

- *Buffer* del gel concentrador. Tris-HCl 0,5 M pH 6,8:

Pesar 6,05 g de Tris y disolverlo en 100 mL de agua destilada. Ajustar el pH a 6,8 con HCl concentrado.

Conservar a 4 °C.

- *Buffer* de carga de muestra 5 X. Tris-HCl 0,6 M pH 6,8, SDS 6 % (p/v); glicerol 30% (v/v); 2-mercaptoetanol 20 % (v/v), azul de bromofenol 0,01 % (p/v):

Tris 0,6 M 0,73 g

SDS 6 % 0,6 g

Glicerol 3 mL

Azul de bromofenol 0,1 % 1 mL

2-Mercaptoetanol 2 mL

Agua destilada c.s.p. 10 mL

Calentar hasta disolver y ajustar a pH 6,8

Conservar a 4 °C.

- SDS 10 % (p/v):

Disolver 10 g de SDS en 100 mL de agua. Calentar para disolver el SDS.

Conservar a temperatura ambiente.

- N, N, N', N'-tetrametil-etilendiamina (TEMED)

- *Buffer* de corrida electroforética. Tris 0,025 M; glicina 192 mM, pH 8,3; SDS 0,1 % (p/v):

Tris base 15,1 g

Glicina 72,1 g

- SDS 5 g
 Agua destilada 5000 ml
- Solución de tinción de geles. Ácido acético 10 % (v/v), etanol 40 % (v/v), azul de Coomassie 0,05 % (p/v):
 Coomassie Brilliant Blue R – 250 0,125 g
 Etanol absoluto 100 mL
 Ácido acético glacial 25 mL
 Agua destilada 125 mL
 - Solución de decoloración. Ácido acético 10 % (v/v), etanol 25 % (v/v):
 Ácido acético glacial 10 mL
 Etanol absoluto 25 mL
 Agua destilada c.s.p. 100 mL

Procedimiento

Preparación del gel

1. Ensamblar los vidrios de acuerdo con las instrucciones del equipo y marcar el límite superior del gel separador (aproximadamente 1 cm antes de llegar a la altura de los dientes del peine).
2. Preparar 10 mL del gel separador (10 %) mezclando las soluciones de acuerdo con la **Tabla 5.4**. Agregar el APS y el TEMED exactamente antes de verter el gel entre las placas (son los catalizadores de la reacción de polimerización).
3. Verter el gel en solución inmediatamente entre los vidrios con pipeta Pasteur. Luego, colocar un mL de etanol 96° o agua destilada para impedir el contacto de la solución del gel con el oxígeno del aire (debido a que el oxígeno inhibe la polimerización). Dejar polimerizar a temperatura ambiente, durante 45 minutos a 1 hora.
4. Retirar el etanol o agua depositados sobre la superficie del gel separador.
5. Preparar 2,5 mL del gel concentrador al 4 % (**Tabla 5.5**).

Tabla 5.4. Preparación del gel separador. Componentes y cantidades para preparar un gel separador al 8 %.

| Solución | Volumen para 8 % |
|---|------------------|
| Buffer del gel separador (0,375 M Tris-HCl pH 8,8) | 2,5 mL |
| SDS 10 % (0,4 % concentración final) | 0,1 mL |
| Acrilamida-bisacrilamida 30 % (8 % concentración final) | 1,33 mL |
| Agua | 2,234 mL |
| APS 10 % | 80 µL |
| TEMED | 6 µL |

Tabla 5.5. Preparación del gel concentrador. Componentes y cantidades para preparar gel concentrador al 4 %.

| Solución | Volumen para 4 % |
|---|------------------|
| Buffer del gel separador (0,125 M Tris-HCl pH 6,8) | 0,625 mL |
| SDS 20 % (0,2 % concentración final) | 0,025 mL |
| Acrilamida-bisacrilamida 30 % (4 % concentración final) | 0,333 mL |
| Agua | 1,472 mL |
| APS 10 % | 40 μ L |
| TEMED | 5 μ L |

- Verter el gel concentrador sobre el gel separador polimerizado (entre los vidrios) e introducir los peines para formar los pocillos.
- Dejar polimerizar durante 45 minutos a 1 hora.

Preparación de la muestra

- Mezclar 1 volumen de la muestra de proteínas con 1/5 de volumen del *buffer* de carga de muestra.
- Desnaturalizar las proteínas a 100 °C (evitar no sobrepasar los 3 minutos de tiempo, para evitar que los tubos se abran durante el tratamiento, eventualmente se puede colocar una abrazadera para tapas de microtubos que se adquieren de firmas comerciales).
- Colocar las muestras en hielo hasta su utilización.

Cargado y corrida electroforética

- Quitar lentamente los peines.
- Lavar los pocillos con agua destilada y luego con *buffer* de corrida electroforética. Llenar la cuba con el mismo tampón, asegurando cubrir todo el gel, antes de cargar la muestra.
- Depositar las muestras en los pocillos del gel usando una micropipeta automática sin exceder el límite de volumen del pocillo (no más de 30 μ L).

Nota: cargar la misma concentración proteica de las diferentes muestras. Para ello, se realiza la cuantificación de proteínas totales en las muestras por algún método; en este TP usamos el método de Bradford.

- Desarrollar la electroforesis a 7-10 V/cm. La electroforesis termina cuando el marcador del frente de corrida alcanza la parte inferior del gel separador.
- Abrir con cuidado para no romper el gel formado entre los dos vidrios que lo contienen.

Fijación y tinción del gel

1. Luego de sacar los geles de los vidrios, colocar en una cuba o *tupper* conteniendo la solución de fijación Coomassie Brilliant Blue R-250 0,05 % en ácido acético 10 % y etanol 50 % durante toda la noche.
2. Decolorar el gel con una solución de ácido acético 10 % y etanol 25 % hasta observar las bandas.
3. Lavar con agua destilada.
4. Interpretar y registrar la corrida electroforética.

Reflexión para la práctica docente

La incorporación de simuladores virtuales de técnicas bioquímicas complejas, como la SDS-PAGE, representa una oportunidad pedagógica notable para el nivel secundario. Aunque estas metodologías pertenecen tradicionalmente al ámbito universitario, su adaptación mediante herramientas digitales permite introducir a los estudiantes en los principios fundamentales del análisis molecular desde una perspectiva accesible, segura y conceptualmente sólida. Desde el punto de vista didáctico, los simuladores facilitan la transición desde una comprensión meramente descriptiva de los procesos biológicos hacia una comprensión procedimental. La posibilidad de manipular variables, como concentración de acrilamida, voltaje o composición del *buffer*, convierte al estudiante en protagonista de su propio aprendizaje, promoviendo habilidades de pensamiento crítico y razonamiento experimental. Asimismo, la simulación reduce la distancia entre teoría y práctica: los conceptos abstractos sobre carga neta, migración electroforética y resolución proteica adquieren un carácter tangible al ser observados en un entorno controlado. Otro aspecto relevante es la dimensión ética y de seguridad. El trabajo con poliacrilamida no polimerizada, fuentes de corriente y colorantes requiere de normativas estrictas que, en muchos contextos escolares, son complejas de abordar. La simulación proporciona un espacio libre de riesgo donde los estudiantes pueden equivocarse, repetir ensayos, analizar errores y reconstruir su propio proceso de aprendizaje sin comprometer la integridad física ni los recursos institucionales. Esta libertad de experimentación promueve una actitud científica genuina, basada en la exploración, la prueba y el refinamiento interpretativo.

Introducir a los estudiantes tempranamente en metodologías como SDS-PAGE no persigue un dominio técnico exhaustivo, sino la construcción de una mirada informada acerca de cómo se analizan las moléculas que sustentan la vida. En este sentido, el simulador actúa como puente entre el nivel secundario y el mundo científico profesional, fomentando vocaciones y fortaleciendo el vínculo entre escuela y ciencia contemporánea.

BIBLIOGRAFÍA

- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Watson, J. D. (1994). *Molecular biology of the cell*. Garland Publishing, New York.
- Biomodel [Reactivos en electroforesis](#) (Consultado: 29/09/2025).
- Biomodel – SDS-PAGE. [Laboratorios virtuales](#) (Consultado: 13/10/2025).
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Cariaga Martínez, A. & Zapata, P. D. (2007). *El laboratorio de Biología Molecular*. Edición ampliada. Editorial Universitaria de Misiones.
- Gornall, A. G., Bardawill, C. J., & David, M. M. (1949). Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J. biol. Chem*, 177(2), 751-766.
- Griffiths, A. J. (2005). *An introduction to genetic analysis*. Macmillan.
- Laemmli, U. K. (1970). SDS-page Laemmli method. *Nature*, 227(5259), 680-685.
- Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kai ser C, Krieger M, Scott M, Zipursky S, Darnell J. *Biología celular y molecular*. Buenos Aires, Editorial Panamericana. 2005.
- Lodish, H. F. (2008). *Molecular cell biology*. Macmillan.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J biol Chem*, 193(1), 265-275.
- Murray, R. K., Granner, D. K., & Rodwell, V. W. (2007). *Bioquímica ilustrada. Manual Moderno*.
- Smith, P. E., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M., ... & Klenk, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical biochemistry*, 150(1), 76-85.

UNIDAD 6. BASES MOLECULARES DEL CICLO CELULAR

CICLO CELULAR

El ciclo celular es el proceso ordenado y altamente regulado mediante el cual una célula duplica su contenido genético y citoplasmático para dividirse en dos células hijas. Este ciclo garantiza la continuidad de la vida, permitiendo el crecimiento de los organismos, la renovación de tejidos y la transmisión fiel de la información genética de una generación a otra. El ciclo celular se divide en tres fases principales: la interfase, la mitosis y la citocinesis (**Figura 6.1**).

Etapas del ciclo celular

La duración del ciclo celular es altamente variable, oscilando desde pocas horas hasta varios días, dependiendo del linaje celular y de variables epigenéticas y ambientales como la disponibilidad de nutrientes y la temperatura. La fidelidad de la división celular reside en la preparación previa y exhaustiva que ocurre durante la interfase, periodo donde se garantiza la duplicación del genoma, la síntesis de proteínas estructurales (como las histonas) y la biogénesis de orgánulos para las futuras células hijas.

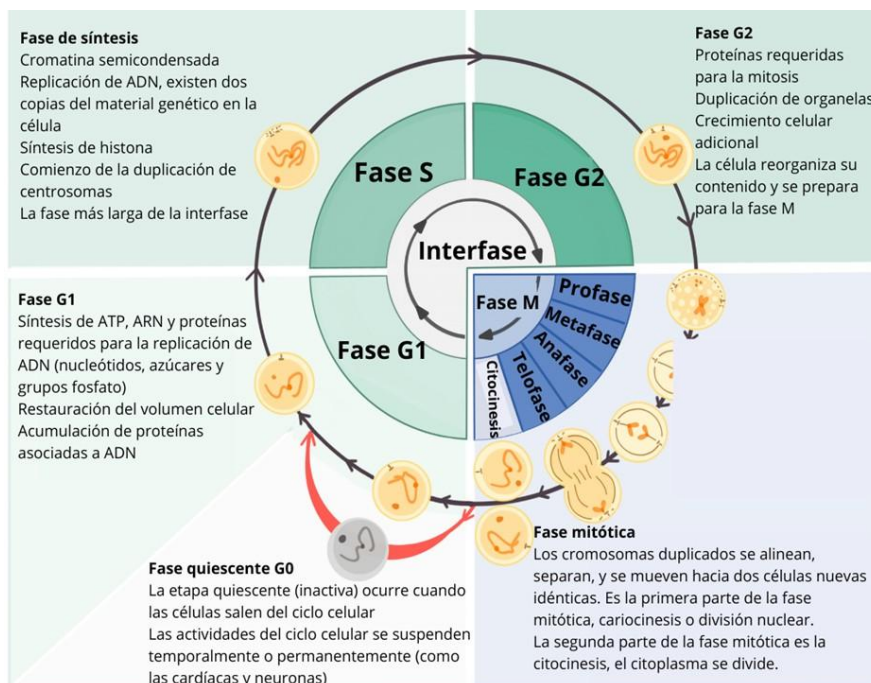


Figura 6.1. El ciclo celular: La división celular, constituida por la mitosis (división del núcleo) y la citocinesis (división del citoplasma), ocurren después de completarse las tres fases preparatorias que constituyen la interfase.

En la interfase ocurren acontecimientos bioquímicos muy intensos; esta puede dividirse en tres etapas: las fases G1 (gap 1), S (de síntesis) y G2 (gap 2).

En la fase G1 se caracteriza por una intensa actividad biosintética y crecimiento volumétrico. La célula duplica su tamaño y aumenta la cantidad de organelas, enzimas y otras moléculas. Se produce una síntesis masiva de ARN y proteínas esenciales para la replicación. En las células animales, los centriolos inician su proceso de separación y duplicación. Entre la fase G1 y la fase S existe un punto de control crítico, de restricción o “punto de no retorno”. En este estadio, la maquinaria celular evalúa factores internos (integridad del ADN) y externos (presencia de mitógenos) para decidir si progresa hacia la fase S o si detiene el proceso. Una vez superado este punto, la célula queda comprometida irreversiblemente a completar la división. Cuando una célula no recibe los estímulos proliferativos necesarios o ha alcanzado un estado de diferenciación terminal, abandona el ciclo en la fase G1 para ingresar en la fase G0. A diferencia de lo que sugiere el término "reposo", las células en G0 mantienen un metabolismo sumamente activo y cumplen funciones especializadas en el tejido. Sin embargo, su maquinaria de replicación se encuentra silenciada. Dependiendo del tipo celular, la entrada en G0 puede ser transitoria (como en los linfocitos o hepatocitos, que pueden reingresar al ciclo ante un estímulo) o permanente (como en las neuronas maduras, que presentan una diferenciación postmitótica definitiva).

En la fase S, el material genético se duplica. Debido a que el material genético está asociado a proteínas, también existe síntesis de estas proteínas para poder asociarse a la nueva molécula de ADN. Posteriormente, la fase G2 actúa como un segundo intervalo de seguridad donde se verifica la fidelidad de la replicación y se sintetizan las proteínas necesarias para el ensamblaje del huso mitótico. Al final de la fase, los cromosomas empiezan a codensarse para entrar en la mitosis.

Mitosis

La mitosis tiene cuatro fases: profase, metafase, anafase y telofase (**Figura 6.2**).

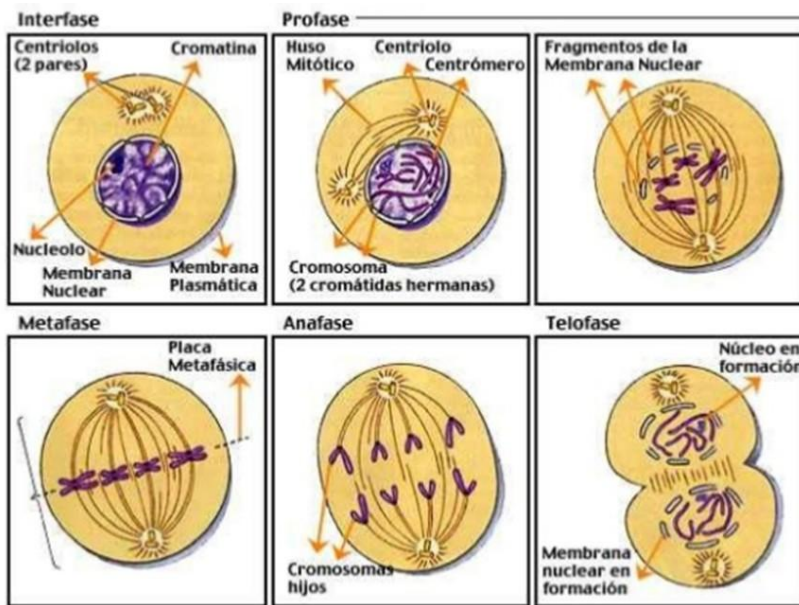


Figura 6.2. Interfase y fases de la mitosis: profase, metafase, anafase y telofase. Tomado de Curtis *et al.* (2008).

En esta figura se observa el esquema de una célula antes de entrar en mitosis, que ya tiene los centriolos duplicados durante la interfase. Una vez que la célula ingresa a mitosis en la etapa de la profase, se empieza a montar el huso mitótico y los centriolos migran hacia los polos. El ADN se condensa y ahora el cromosoma está formado por dos cromátidas hermanas con información genética idéntica porque en la fase S el material genético ya se duplicó. En una etapa tardía de la profase, la envoltura nuclear se desensambla, el huso mitótico se forma correctamente y los cromosomas se condensan más hasta su estado de máxima condensación en la metafase, donde se van a ubicar en la placa metafásica. En la anafase, cada cromátida hermana migra hacia polos opuestos, convirtiéndose en los cromosomas de las dos futuras células hijas. En la telofase, la envoltura nuclear se forma alrededor de ambos grupos de cromosomas y el material genético comienza a descondensarse. Se forma el anillo contráctil (en células animales). Cuando se forma el anillo contráctil, ocurre la citocinesis, que es la división del citoplasma para formar dos células hijas idénticas a la célula progenitora.

Reproducción sexual

La alternancia entre diploidía ($2n$) y haploidía (n) constituye un principio fundamental de los ciclos de vida sexuales en organismos eucariotas, y encuentra su articulación biológica en los procesos de meiosis y fecundación. Se establece un ciclo biológico continuo que alterna estados haploides y diploides, preservando el número cromosómico característico de la especie y promoviendo simultáneamente la diversidad genética que sustenta la evolución (**Figura 6.3**).

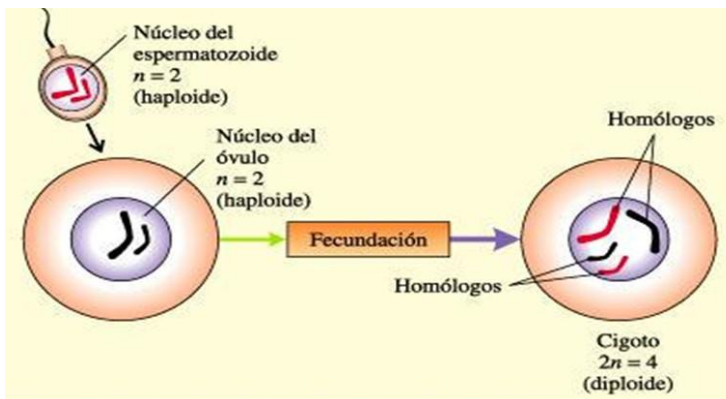


Figura 6.3. Ciclo biológico que alterna estados haploides y diploides. Tomado de Curtis *et al.* (2008).

La meiosis es una división celular reduccional mediante la cual una célula diploide origina gametos haploides, asegurando la reducción del número cromosómico a la mitad. Este proceso no solo garantiza la estabilidad del número de cromosomas a lo largo de las generaciones, sino que además introduce variabilidad genética a través del entrecruzamiento y la segregación independiente de los cromosomas homólogos.

La fecundación, por su parte, restituye la condición diploide mediante la fusión de dos gametos haploides, integrando la información genética de ambos progenitores en un cigoto diploide. De este modo, la fertilización compensa la reducción cromosómica producida en la meiosis. El cigoto formado tiene dos juegos de cromosomas ($2n$), uno que vino de la madre y el otro, del papá. Estos cromosomas se llaman homólogos porque tienen la misma morfología y una información similar (no necesariamente idéntica) (Figura 6.4).

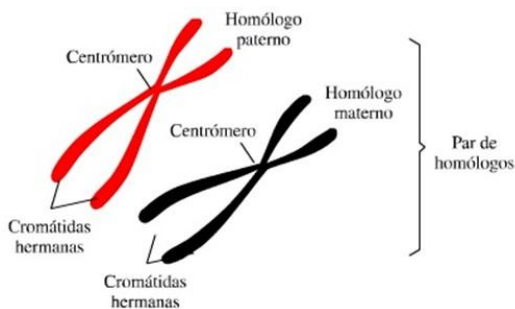


Figura 6.4. Cromosomas homólogos en metafase. Cada par de cromosomas homólogos está formado por dos cromátidas hermanas unidas por el centrómero, uno vino del padre y el otro de la madre.

Meiosis

Es la división celular para la formación de células haploides. Esta se divide en dos grandes grupos: la meiosis I y la meiosis II, y cada una tiene sus etapas. Como se observa en la Figura 6.5, antes de entrar a la meiosis, en la interfase también se pueden ver la cromatina, la membrana nuclear y los centriolos duplicados.

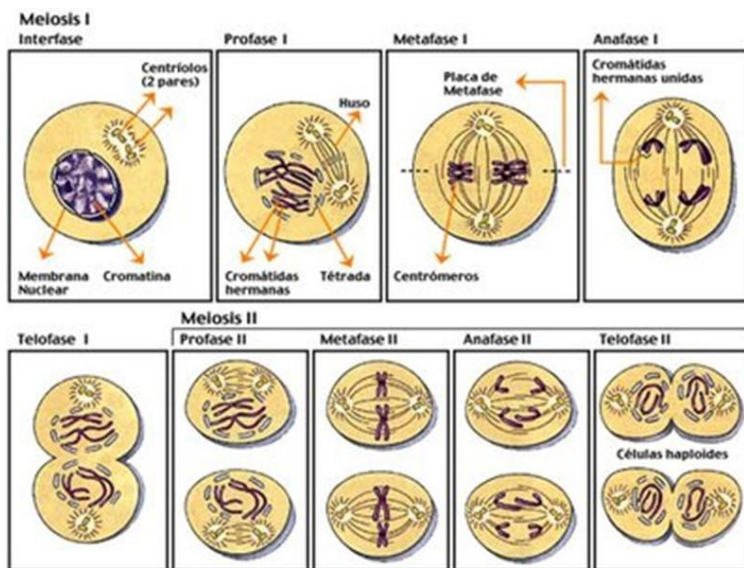


Figura 6.5. División celular para la formación de células haploides. Fases de la meiosis. Tomado de Curtis *et al.* (2008).

En la profase I de la meiosis I, se empieza a montar el huso mitótico, la envoltura nuclear comienza a desensamblarse y los cromosomas homólogos se aparean. Cada cromosoma homólogo está constituido por dos cromátidas hermanas, cuando se aparean, forman lo que se llama la tétrada; en este momento es donde ocurre el intercambio del material genético o *crossing over* que contribuye con la variabilidad genética. En la metafase I, los cromosomas homólogos se disponen en la placa de la metafase. El hecho de que el cromosoma materno o paterno se ponga de uno u otro polo es al azar; es decir, que cada uno de los polos se lleva uno de los cromosomas homólogos. En la anafase I, cada cromosoma homólogo migra hacia uno u otro polo. El cromosoma está formado por dos cromátidas unidas. En la telifase I, se empieza a formar una envoltura nuclear, el ADN se empieza a descondensar y luego se ingresa a la meiosis II.

En la profase II de la meiosis II, se desensambla la envoltura nuclear, el ADN se condensa y los centriolos migran hacia los polos. En la metafase II, el huso está perfectamente montado y los cromosomas se ubican en la placa de la metafase. En la anafase II, cada una de las cromátidas migra para uno u otro polo. En la telifase II, se forma la envoltura nuclear, el ADN se descondensa y comienza a formarse el anillo contráctil para que ocurra la división del citoplasma. El resultado es cuatro células hijas que tienen la mitad de la información de la célula progenitora y, además, su información es diferente.

En la **Tabla 6.1** se compara la mitosis y meiosis según criterios estructurales, funcionales y genéticos.

Tabla 6.1. Diferencias principales entre mitosis y meiosis.

| Característica | Mitosis | Meiosis |
|---|--|---|
| Tipo de división | Ecuacional | Reduccional (meiosis I) seguida de ecuacional (meiosis II) |
| n.º de divisiones | Una | Dos (meiosis I y meiosis II) |
| n.º de células hijas | 2 | 4 |
| Ploidía de las células hijas | Igual a la célula madre: $2n \rightarrow 2n$ $n \rightarrow n$ | Mitad del número cromosómico: $2n \rightarrow n$ |
| Identidad genética | Genéticamente idénticas entre sí y a la célula madre | Genéticamente diferentes entre sí y a la célula madre |
| Sinapsis de homólogos | No ocurre | Ocurre en profase I |
| Entrecruzamiento (<i>crossing-over</i>) | No | En profase I |
| Separación clave | Cromátides hermanas | Meiosis I: cromosomas homólogos; Meiosis II: cromátides hermanas |
| Función biológica | Crecimiento, reparación, reproducción asexual | Formación de gametos y variabilidad genética |
| Variabilidad genética | No genera variabilidad significativa | Genera variabilidad por recombinación y segregación independiente |
| Tipo de células donde ocurre | Células somáticas | Células germinales |

SEÑALIZACIÓN CELULAR

La regulación del ciclo celular y la señalización celular son procesos intrínsecamente vinculados que garantizan que la división ocurra solo bajo condiciones óptimas. Las señales extracelulares, como los factores de crecimiento, activan cascadas de transducción de señales que convergen en el núcleo para inducir la expresión de ciclinas y quinasas dependientes de ciclinas (CDK). Estos complejos actúan como los "motores" que permiten a la célula superar los puntos de control (*checkpoints*), especialmente el paso de la fase G₁ a la fase S. Si la señalización es promitótica y el ADN está íntegro, la célula progresa. Por el contrario, ante señales de estrés o ausencia de factores de supervivencia, las rutas de señalización activan inhibidores (como p21 o p53) que detienen el ciclo para reparar daños o, en casos extremos, inducir la apoptosis.

Señalización celular y transducción de señales

La señalización celular es el proceso fundamental de comunicación mediante el cual las células perciben y responden a estímulos ambientales para coordinar funciones biológicas complejas. Mientras que la señalización se refiere al intercambio de mensajes (ligandos), la transducción de señales es el proceso de interpretación y transformación de dicha señal extracelular en una respuesta intracelular específica.

A continuación, se detallan los elementos del proceso de comunicación:

- La señal (ligando) es una molécula portadora de información que puede ser hormona, neurotransmisor o metabolito.
- La célula señalizadora sintetiza y libera el ligando, generalmente mediante exocitosis.
- La célula diana (*target*) posee el receptor específico para la señal, garantizando la especificidad de la respuesta.
- La cascada de señalización es el conjunto de eventos moleculares (fosforilaciones, liberación de segundos mensajeros) que amplifican y distribuyen la señal dentro de la célula.

La comunicación se clasifica según la distancia y el medio por el cual viaja el ligando en señalización local y señalización a distancia. Dentro de las señalizaciones locales se encuentran:

- Señalización parácrina: la señal actúa sobre células adyacentes de distinto linaje (p. ej., factores de crecimiento).
- Señalización autocrina: la célula responde a sus propias señales (común en el sistema inmune y procesos tumorales).
- Señalización yuxtácrina (contacto dependiente): requiere contacto físico directo mediante uniones tipo GAP, integrinas o proteínas de membrana.

Entre las señalizaciones a distancia, se encuentran:

- Señalización endócrina: las hormonas viajan por el torrente sanguíneo hacia órganos distantes.
- Señalización neuronal (sináptica): los neurotransmisores son liberados en la hendidura sináptica para actuar sobre una neurona o célula efectora contigua.

Clasificación de receptores y mecanismo de acción

La célula diana tiene receptores específicos en su superficie para reconocer cada señal y dar respuesta a esa señal. Dentro de los receptores tenemos de distintos tipos:

- **Receptores intracelulares o citoplasmáticos:** son utilizados por moléculas liposolubles (esteroides, hormonas tiroideas, vitamina D) que atraviesan la bicapa lipídica por difusión simple. Estos receptores actúan como factores de transcripción que, al unirse al ligando, se translocan al núcleo para unirse a secuencias específicas de ADN y regular la expresión génica.
- **Receptores de membrana:** destinados a ligandos hidrofílicos que no pueden atravesar la membrana. Estos se subclasifican en:
 - **Canales iónicos regulados por ligando:** al unirse la señal, el canal cambia su conformación permitiendo el flujo selectivo de iones (Na^+ , K^+ , Cl^-), alterando el potencial de membrana de forma casi instantánea.
 - **Receptores acoplados a proteínas G (GPCR):** proteínas de siete dominios transmembrana. Al activarse, promueven el intercambio de GDP por GTP en la subunidad α de la proteína G, provocando su disociación del complejo $\beta\gamma$ y la activación de enzimas efectoras o segundos mensajeros (como el AMPc).
 - **Receptores catalíticos (enzimáticos):** generalmente son monómeros que se dimerizan tras la unión del ligando. Poseen actividad enzimática intrínseca (como la tirosina quinasa), autofosforilándose para reclutar y activar proteínas señalizadoras internas.

Naturaleza de la respuesta celular

La transducción de señales culmina en una alteración del comportamiento celular, la cual puede clasificarse según su cinética:

- **Respuestas rápidas:** ocurren en milisegundos o minutos. Implican la modificación de proteínas preexistentes (activación enzimática, cambios en el citoesqueleto o permeabilidad).
- **Respuestas lentas:** requieren de horas o días, ya que implican cambios en la expresión génica (transcripción y traducción de nuevas proteínas).

Tipo de respuesta celular

Los tipos de respuestas biológicas pueden ser:

1. **Metabólica:** activación o inhibición de rutas bioquímicas.
2. **Morfología y movimiento:** cambios en la arquitectura del citoesqueleto.
3. **Ciclo celular:** inducción a la proliferación, diferenciación o supervivencia.
4. **Muerte celular:** activación del programa de apoptosis.
5. **Retroalimentación:** estimulación para la liberación de nuevas señales químicas.

Las células rara vez responden a una única señal de forma aislada. La respuesta final es el resultado de la integración de múltiples señales que pueden converger en una misma vía. Este acoplamiento permite que una célula prolifere o entre en apoptosis basándose en la suma de estímulos prosupervivencia y promitóticos presentes en su microambiente.

CONTROL DEL CICLO CELULAR

La duración del ciclo celular es una propiedad biológica sumamente variable, determinada por el linaje celular y las condiciones metabólicas del microentorno. Mientras que las células embrionarias de *Xenopus* completan el ciclo en aproximadamente 30 minutos, otros sistemas como las levaduras requieren entre 1,5 y 3 horas. En tejidos humanos, se observa una escala diversa: las células del epitelio intestinal presentan una renovación cercana a las 12 horas, los fibroblastos en cultivo promedian las 20 horas, y los hepatocitos pueden permanecer en un estado de quiescencia funcional durante periodos de hasta un año antes de retomar la división.

La quiescencia es un estado reversible de reposo celular (fase G₀) en el que las células permanecen metabólicamente activas, pero no proliferan. En este estado, las células han salido transitoriamente del ciclo celular en respuesta a señales fisiológicas o condiciones del entorno, y conservan la capacidad de reingresar al ciclo cuando reciben estímulos adecuados, como factores de crecimiento o señales de daño tisular.

El ciclo celular no es un proceso aislado; ocurre simultáneamente con las funciones fisiológicas basales de la célula. Durante todas las fases, la célula mantiene un metabolismo dinámico que incluye síntesis y degradación continua de macromoléculas; regulación del transporte transmembrana (importación de nutrientes y excreción de desechos); control del tráfico intracelular y respuesta constante a estímulos externos. Estas actividades, sumadas a la maquinaria de división, representan un alto costo energético que la célula debe gestionar mediante una regulación estricta.

Puntos de control del ciclo celular

La progresión a través de las etapas del ciclo está supervisada por vías bioquímicas de control de calidad o puntos de control (o *checkpoints*). Estos actúan como "sensores moleculares" que detienen el ciclo si no se cumplen requisitos como alcanzar un volumen celular crítico, disponibilidad suficiente de nutrientes y factores de crecimiento; integridad del material genético (ausencia de mutaciones o roturas) o el correcto ensamblaje del huso mitótico.

La decisión de una célula de entrar en división depende de la integración de dos tipos de señales, externas e internas.

En organismos multicelulares, la proliferación celular debe ser un proceso coordinado y cooperativo. La pérdida de control sobre el ciclo celular, ya sea por la falla en los puntos de control o por una señalización mitogénica hiperactiva, conduce a un crecimiento celular desmedido. Estas células transformadas pueden invadir tejidos adyacentes y metastatizar, comprometiendo la organización estructural y la viabilidad del organismo, fenómeno que define fisiopatológicamente al cáncer. Cabe aclarar que las señales mitogénicas son estímulos extracelulares, generalmente factores de crecimiento, hormonas o citocinas, que inducen a las células a entrar en el ciclo celular y proliferar. Estas señales activan vías de transducción que promueven la expresión de genes necesarios para la progresión desde la fase G1 hacia la fase S.

Ciclinas y kinasas dependientes de ciclinas

El control interno del ciclo reside en la actividad de complejos proteicos heterodiméricos compuestos por dos subunidades: una catalítica (Cdk) y una reguladora (ciclina). Las Cdk son quinasas dependientes de ciclina y carecen de actividad enzimática en estado monomérico. Su concentración permanece constante a lo largo del ciclo. Su función es fosforilar proteínas diana específicas para activar procesos clave. Las ciclinas son proteínas cuya concentración fluctúa cíclicamente. Su síntesis y degradación programada determinan los periodos de actividad de las Cdk y confieren especificidad de sustrato al complejo (**Figura 6.6**). La activación de los complejos Cdk–ciclina ocurre en múltiples etapas. En primer lugar, la unión de la ciclina a la Cdk induce un cambio conformacional que produce una activación parcial de la quinasa. Posteriormente, la Cdk es fosforilada en un residuo activador específico por la quinasa activadora de Cdk (CAK), lo que conduce a su activación completa. Adicionalmente, la actividad del complejo puede ser modulada por fosforilaciones inhibitorias en otros residuos y por la acción de fosfatasa que eliminan dichas marcas, asegurando un control preciso y reversible de la progresión del ciclo celular.

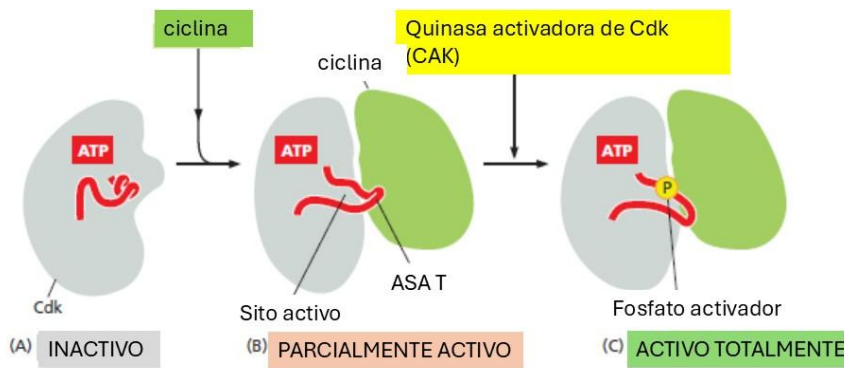


Figura 6.6. Bases estructurales de la activación de las Cdk. Tomado de Alberts *et al.* (2015).

Clasificación y secuencialidad de los complejos Cdk-ciclinas

En las células humanas, la transición unidireccional por las fases del ciclo está mediada por complejos Cdk-ciclinas que actúan de forma secuencial (**Figura 6.7**).

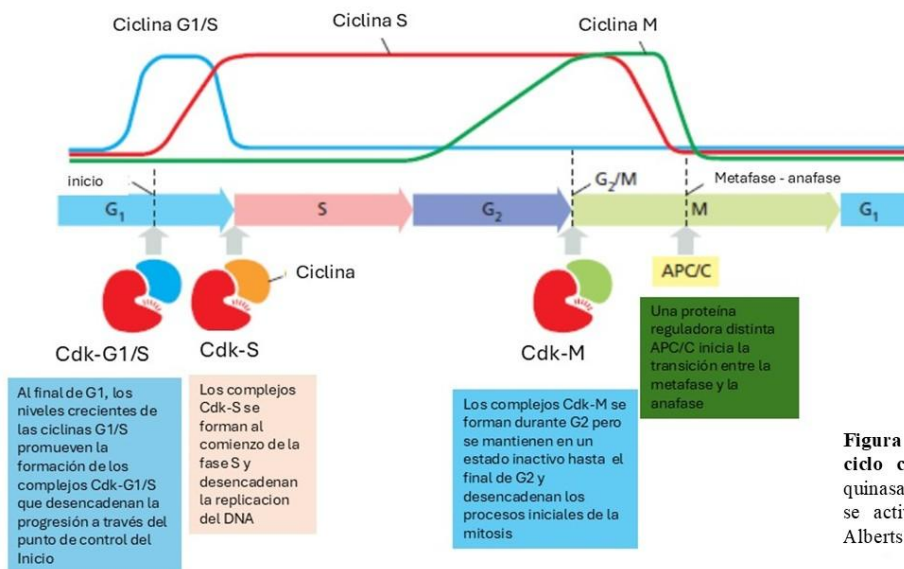


Figura 6.7. Sistema de control del ciclo celular: depende de proteínas quinasas dependientes de ciclinas que se activan cíclicamente. Tomado de Alberts *et al.* (2015).

- Los complejos de ciclinas Cdk-Ciclina G1 se expresan y ensamblan en respuesta a señales mitogénicas externas. Su función principal es promover el pasaje de G1 a la fase S, estimulando la síntesis de las ciclinas necesarias para las etapas subsiguientes y permitiendo que la célula supere el punto de restricción. En las células humanas, este complejo lo forman las Cdk4 y la Cdk6 junto con la ciclina D.
- Los complejos Cdk-ciclina G1/S preparan a la célula para la fase S al estimular la síntesis de enzimas que participan en la duplicación del ADN. En las células humanas, la Cdk2 y la ciclina E forman estos complejos.
- Los complejos de Cdk-ciclina S fosforilan y activan de forma selectiva las proteínas de los orígenes de replicación. Su regulación asegura que el genoma se replique

exactamente una vez por ciclo, manteniendo la estabilidad cariotípica en las células hijas. Esto ocurre una vez por cada ciclo celular; es decir, en cada ciclo cada cromosoma se replica sólo una vez y se mantiene constante la cantidad de cromosomas en las células hijas. En las células humanas, la Cdk2 y la ciclina A son las que forman estos complejos.

- Los complejos Cdk-ciclina M o factor promotor de la mitosis (MPF, del inglés *Mitosis Promoting Factor*) comienzan a sintetizarse durante S y G₂, pero se activan solo tras verificar la integridad de la replicación del ADN. Una vez activados, inducen la condensación cromosómica, la desintegración de la envoltura nuclear, el ensamblaje del huso mitótico, la alineación cromosómica en la placa ecuatorial, y la activación de la transición metafase-anafase. En las células humanas, la Cdk1 y la ciclina B son las que forman estos complejos. La inactivación de estos complejos es tan crítica como su activación. Una vez que la ciclina cumple su función, es marcada para su degradación en el proteasoma. La desaparición de la ciclina mitótica, por ejemplo, es el evento que permite la descondensación cromosómica y la reconstitución nuclear tras la mitosis.

Este sistema de síntesis y degradación sucesiva garantiza que el ciclo celular sea un proceso irreversible y unidireccional. Además, la actividad de los complejos Cdk–ciclina está finamente regulada por inhibidores de Cdk (CKI, *cyclin-dependent kinase inhibitors*), como las familias INK4 y Cip/Kip, que pueden unirse a estos complejos e inhibir su actividad, bloqueando la progresión del ciclo celular en respuesta a señales antiproliferativas o daño en el ADN. Asimismo, la actividad de estos complejos también se regula mediante fosforilaciones inhibitorias en residuos específicos de la Cdk, que mantienen al complejo en un estado inactivo hasta que dichas marcas son removidas por fosfatasa, permitiendo así su activación en el momento adecuado (**Figura 6.8**).

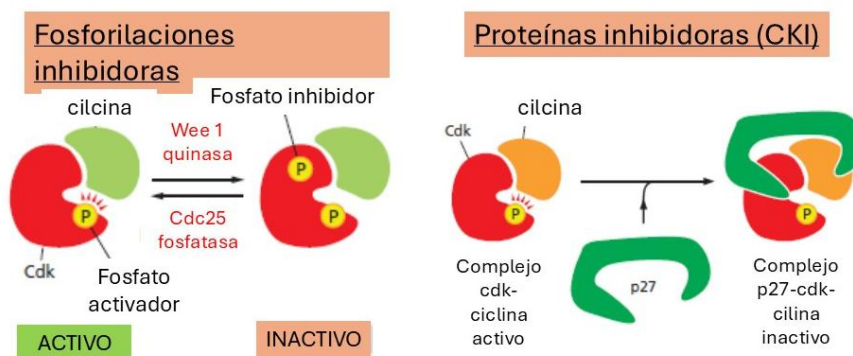


Figura 6.8. Fosforilaciones inhibitorias y proteínas inhibidoras de Cdk (CKI) pueden inhibir la actividad Cdk. Tomado de Alberts *et al.* (2015).

Por el descubrimiento de estos reguladores universales, Leland Hartwell, Tim Hunt y Paul Nurse fueron galardonados con el Premio Nobel de Medicina en 2001.

Mecanismo de regulación del ciclo celular

Como ya se mencionó, la progresión del ciclo celular es un proceso altamente regulado por puntos de control localizados en las transiciones G1/S, G2/M y en la metafase mitótica. Estos verifican y modulan el avance celular en respuesta a señales intrínsecas y factores ambientales, operando fundamentalmente mediante la actividad de los complejos Cdk-ciclina.

Si las condiciones celulares (tamaño, integridad del genoma, disponibilidad de nutrientes o anclaje a la matriz) son deficientes, el ciclo se detiene para activar mecanismos de reparación. En caso de que el daño sea irreversible, se desencadena la apoptosis para prevenir la propagación de anomalías. La pérdida de fidelidad en estos controles es un factor determinante en la inestabilidad genómica y la oncogénesis.

La fase G1 es la fase más variable y metabólicamente activa. En ella destacan dos hitos de regulación: el punto de restricción y el de control de daño del ADN en G1. El punto de restricción es considerado el principal punto de no retorno. La célula evalúa su potencial replicativo y factores externos. Si las señales son favorables, la célula se compromete a entrar en fase S; de lo contrario, puede retirarse del ciclo hacia un estado de latencia o quiescencia, la fase G0. El punto de control de daño del ADN en G1 monitorea la integridad genómica. Ante daños irreparables, se produce una estabilización de la proteína supresora de tumores p53, la cual detiene el ciclo o induce la muerte celular programada.

Durante la fase S y G2, el punto de control de daño del ADN supervisa la calidad de la síntesis de material genético en tiempo real. Antes de la entrada en mitosis, se activan el punto de control de daño del ADN en G2 y el punto de control de ADN no replicado, asegurando que la división no comience hasta que la duplicación genómica sea completa y fidedigna.

En la fase M, el punto de control del huso (SAC) impide la transición a anafase hasta que todos los cromosomas estén correctamente alineados y anclados a los microtúbulos del huso; y el punto de control de segregación supervisa la correcta separación cromosómica antes de finalizar la citocinesis. Mientras que SAC es un punto de control, el complejo promotor de la anafase o ciclosoma (APC/C) es una E3 ubiquitina ligasa de gran tamaño que funciona como el interruptor maestro para finalizar la mitosis e iniciar una nueva fase G1. Su función principal es marcar proteínas específicas con cadenas de ubiquitina para que sean degradadas por el proteasoma, permitiendo que el ciclo celular avance de forma irreversible.

El APC/C actúa principalmente en dos momentos críticos: en la transición de metafase a anafase y en la salida de la mitosis. En el primer caso, destruye la securina y se libera una enzima llamada separasa, que corta las cohesinas que mantienen unidas las cromátides hermanas. Esto permite que los cromosomas se separen hacia los polos opuestos. En la salida de la mitosis, el APC/C degrada las ciclinas M y S lo que inactiva a las Cdk's mitóticas y permite que la célula descondense los cromosomas, reforme la envoltura nuclear y realice la citocinesis (**Figura 6.9**).

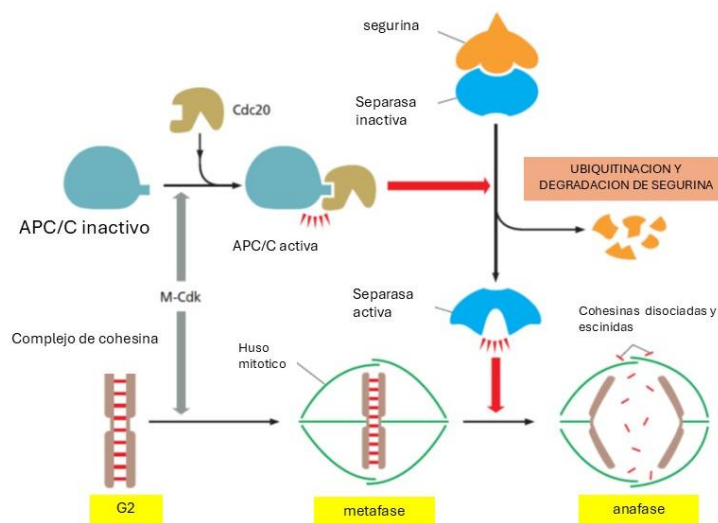


Figura 6.9. El APC/C desencadena la separación de cromátides hermanos y la finalización de la mitosis. Tomado de Alberts *et al.* (2015).

El APC/C no actúa solo; su especificidad depende de su unión a coactivadores en momentos distintos. Cdc20 activa a APC/C al inicio de la anafase para separar los cromosomas y Cdh1 mantiene al APC/C activo durante el final de la mitosis y la fase, asegurando que las ciclinas se mantengan bajas para que la célula no reinicie el ciclo prematuramente.

El APC/C es el blanco del Punto de Control del Armado del Huso. Si un solo cromosoma no está correctamente anclado a los microtúbulos, se envían señales inhibitorias que bloquean al APC/C-Cdc20. Esto detiene la célula en metafase, evitando una segregación errónea que causaría aneuploidía.

Papel de la p53

El mal funcionamiento de estos puntos de control, especialmente en los puntos de daño del ADN y del huso, conduce a la catástrofe mitótica. Este evento se define como la incapacidad de detener el ciclo ante anomalías graves, derivando en una segregación cromosómica asimétrica.

Si la célula falla en activar la apoptosis tras una catástrofe mitótica, se generan poblaciones celulares con aneuploidía e inestabilidad cromosómica, pilares fundamentales de la progresión

tumoral. En este contexto, la proteína p53 cumple un rol crítico como "guardián del genoma", al inhibir las quinasas dependientes de ciclinas (Cdk) y permitir la reparación del ADN o, en última instancia, la eliminación de la célula dañada. La proteína p53 funciona como un factor de transcripción que monitorea la integridad del ADN. En condiciones normales, los niveles de p53 son muy bajos porque es degradada constantemente. Sin embargo, ante estrés celular (daño en el ADN por radiación o químicos, hipoxia o estrés oncogénico), p53 se estabiliza y su concentración aumenta rápidamente en el núcleo. Una vez activa, p53 se une al ADN y promueve la expresión de genes como p21. Esta proteína actúa como un inhibidor de las quinasas dependientes de ciclinas (CDI), bloqueando los complejos Cdk-ciclina. Esto detiene el ciclo celular (generalmente en la transición G1/S), otorgando tiempo a la célula para que los mecanismos de reparación arreglen el daño.

Si el daño es reversible, p53 facilita la activación de enzimas reparadoras. Una vez solucionado el problema, los niveles de p53 bajan y el ciclo continúa. Si el daño es irreversible, p53 activa genes proapoptóticos (como *Bax*). Esto induce la apoptosis o muerte celular programada para evitar que una célula con mutaciones peligrosas se divida y pueda dar origen a un tumor (**Figura 6.10**).

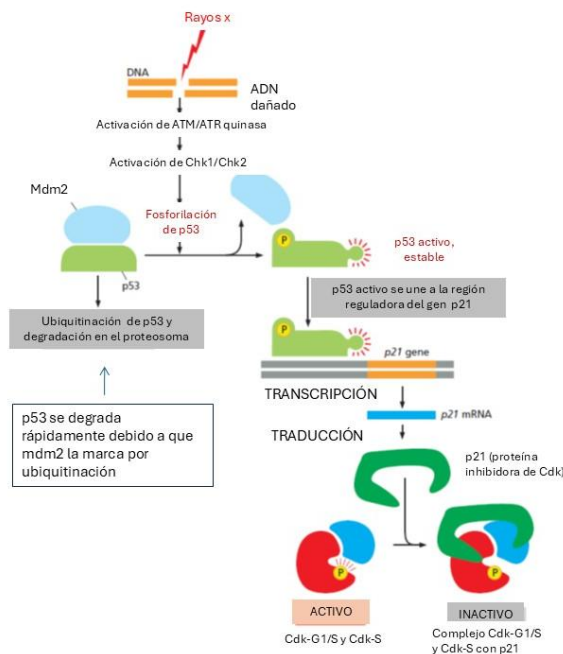


Figura 6.10. Papel de la p53: el daño del ADN detiene el ciclo celular. Tomado de Alberts *et al.* (2015).

Muerte celular: apoptosis y necrosis

La muerte celular se clasifica fundamentalmente en dos modalidades con mecanismos y consecuencias biológicas divergentes: la apoptosis y la necrosis (**Tabla 6.1**). Mientras la

primera representa un proceso programado y fisiológico, la segunda se asocia generalmente a injurias agudas y daño tisular descontrolado.

Tabla 6.1. Diferencias entre apoptosis y necrosis.

| Característica | Apoptosis | Necrosis |
|-------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------|
| Naturaleza | Programada / Fisiológica | Accidental / Patológica |
| Integridad de membrana | Mantenida (formación de vesículas) | Pérdida (lisis celular) |
| Gasto Energético | Sí (dependiente de ATP) | No (Pasivo) |
| Inflamación | Ausente | Presente y reactiva |
| Destino Celular | Fagocitosis por cuerpos apoptóticos | Lisis y daño tisular colateral |

La apoptosis o muerte celular programada es un proceso activo, dependiente de energía (ATP), mediante el cual la célula ejecuta un programa de "suicidio" altamente regulado.

Se caracteriza por la fragmentación del ADN (cariorraxis) y la condensación de la cromatina. El citoplasma y los orgánulos se segmentan en vesículas rodeadas de membrana plasmática denominadas cuerpos apoptóticos. Al mantener los componentes celulares confinados en membranas, se evita la liberación de enzimas hidrolíticas al espacio extracelular. Estos cuerpos son reconocidos y fagocitados por macrófagos y otras células del sistema inmunitario sin desencadenar una respuesta inflamatoria, lo que permite una depuración celular ordenada y silenciosa.

A diferencia de la apoptosis, la necrosis o muerte celular accidental, es un proceso pasivo e independiente de energía que ocurre como respuesta a un daño celular severo (isquemia, toxinas, trauma). La célula experimenta un aumento de volumen (oncosis) que culmina en la lisis o ruptura de la membrana plasmática. Esto provoca el vertido indiscriminado de los contenidos citoplasmáticos y enzimas lisosomales al espacio intersticial. La liberación de detritos celulares actúa como una señal de peligro que atrae masivamente a células del sistema inmune. Esto desencadena una reacción inflamatoria aguda que, si bien busca limpiar el área, puede provocar daño colateral en el tejido circundante debido a la liberación de mediadores citotóxicos (**Figura 6.11**).

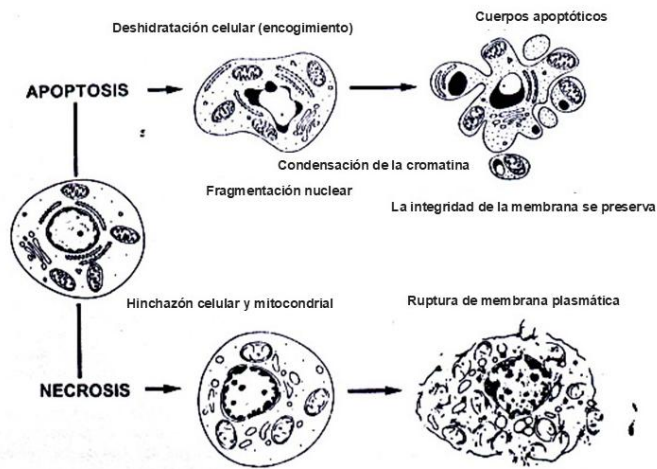


Figura 6.11. Apoptosis vs. necrosis. Tomado de Alberts *et al.* (2015).

BIBLIOGRAFÍA

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2015). *Molecular Biology of the Cell* (6th ed.). Garland Science.

UNIDAD 7. APLICACIONES DE LA BIOLOGÍA MOLECULAR

LA BIOTECNOLOGÍA Y LAS HERRAMIENTAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

La biotecnología se define como el conjunto de aplicaciones tecnológicas que utilizan sistemas biológicos y organismos vivos (o sus derivados) para la creación o modificación de productos y procesos para usos específicos. En la actualidad, el alcance de esta disciplina se ha expandido exponencialmente gracias a la integración de las herramientas de biología molecular, las cuales permiten la manipulación y el estudio de los ácidos nucleicos y proteínas con una precisión sin precedentes.

Estas herramientas, que incluyen técnicas como la PCR (estudiada en el Capítulo 3), la electroforesis (estudiada en el Capítulo 2), la secuenciación de ADN y las enzimas de restricción, actúan como el brazo ejecutor de la biotecnología. Proporcionan la metodología necesaria para aislar, amplificar y analizar secuencias genéticas específicas, facilitando la comprensión de la arquitectura genómica de los organismos.

Tecnología del ADN recombinante y enzimas de restricción

La tecnología del ADN recombinante es el eje central de la ingeniería genética. Es el procedimiento mediante el cual se inserta un segmento de ADN foráneo en un vector replicativo. Este "corte y confección" genético depende críticamente de las enzimas de restricción. Estas enzimas son endonucleasas y herramientas de corte específico que permiten la fragmentación precisa del ADN, facilitando la inserción de secuencias exógenas en genomas receptores. Las endonucleasas de restricción (tipo II) reconocen secuencias palindrómicas específicas. Dependiendo de la enzima (p. ej., *EcoRI* o *SmaI*), pueden generar diferentes extremos: cohesivos o romos. Los extremos cohesivos (*sticky ends*) facilitan la hibridación por complementariedad de bases. Los extremos romos (*blunt ends*) requieren ligaciones más energéticas, pero son versátiles. La ADN ligasa es la enzima encargada de sellar el enlace fosfodiéster entre el inserto y el vector, estabilizando la nueva molécula recombinante.

Vectores de clonación y expresión

Los vectores son moléculas de ADN transportadoras que permiten la replicación y, en ocasiones, la expresión de un gen exógeno en una célula huésped.

El objetivo principal de utilizar vectores de clonación es obtener múltiples copias de un fragmento de ADN. Los más comunes son los plásmidos, moléculas circulares extracromosómicas que poseen un origen de replicación *ori* independiente.

Los vectores de expresión tienen otros elementos además de los de replicación; contienen señales de control transcripcional y traduccional (promotores fuertes, sitios de unión al ribosoma y terminadores) que permiten al huésped producir la proteína codificada por el inserto.

Un vector funcional debe poseer un sitio de clonación múltiple (MCS) con dianas únicas para enzimas de restricción y marcadores de selección (como genes de resistencia a antibióticos) para distinguir las células transformadas de las que no lo están.

Etapas de la clonación

Las etapas de la clonación mediante tecnología de ADN recombinante consisten en pasos ordenados que permiten aislar, insertar y multiplicar una secuencia o gen de interés. En primer lugar, se obtiene el fragmento de ADN que se desea clonar (inserto), el cual puede ser aislado y cortado con enzimas de restricción, amplificado por PCR u obtenido a partir de ARNm mediante retrotranscripción. De manera paralela, se prepara el vector, que también es digerido con las mismas enzimas para generar extremos compatibles.

A continuación, el inserto se une al vector mediante la acción de la ADN ligasa, formando una molécula de ADN recombinante (ADNr) estable, que luego se introduce en una célula anfitriona a través de un proceso denominado transformación. Una vez dentro de la célula, el ADNr se replica.

Posteriormente, se seleccionan las células que han incorporado correctamente el ADN recombinante, empleando marcadores de selección como genes de resistencia a antibióticos, lo que permite eliminar las células no transformadas y aislar únicamente aquellas que contienen el vector. En muchos sistemas, esta selección se complementa con métodos de screening, como la inactivación de genes reporteros (por ejemplo, lacZ), que permiten diferenciar entre vectores con y sin inserto. De este modo, se obtienen clones recombinantes portadores del fragmento de interés.

Finalmente, se lleva a cabo el análisis de la secuencia o del gen clonado para confirmar su presencia, orientación e integridad. Esto puede realizarse mediante PCR, digestión con enzimas de restricción y electroforesis, o secuenciación del ADN. En aquellos casos en que se ha utilizado un vector de expresión, también es posible evaluar la funcionalidad del gen insertado mediante el análisis de la expresión del producto génico, ya sea a nivel de ARN (RT-PCR) o de proteína, utilizando técnicas como SDS-PAGE, Western blot o ensayos de actividad enzimática, lo que permite verificar no solo la correcta inserción sino también la funcionalidad biológica del gen clonado.

Métodos de transformación en sistemas biológicos

La transferencia de ADN al interior de la célula varía según la estructura de la pared y membrana celular del organismo receptor.

En bacterias y levaduras se utiliza la competencia artificial. En bacterias, el tratamiento con CaCl_2 seguido de un choque térmico facilita la entrada del ADN. En levaduras, se emplea acetato de litio y PEG para desestabilizar la pared celular.

En plantas, la técnica de biobalística utiliza micropartículas de oro o tungsteno recubiertas de ADN que se disparan sobre el tejido vegetal. Alternativamente, se usa la bacteria *Agrobacterium tumefaciens*, que posee la capacidad natural de transferir una parte de su plásmido (T-DNA) al genoma de la planta.

Debido a que los mamíferos no poseen pared celular, se emplean métodos como la lipofección (uso de liposomas), la electroporación o la transducción viral, donde los virus modificados (lentivirus o adenovirus) inyectan el material genético con alta eficiencia.

Organismos genéticamente modificados

Un organismo genéticamente modificado (OGM) es cualquier organismo vivo que posea una combinación nueva de material genético obtenida mediante el uso de la biotecnología moderna. Las plantas transgénicas fueron desarrolladas principalmente para resistir herbicidas, plagas (como el maíz Bt) o mejorar el contenido nutricional (arroz dorado) o para resistir condiciones climáticas implacables como la sequía. Los animales genéticamente modificados son utilizados mayoritariamente como modelos de enfermedades humanas, biorreactores para la producción de fármacos en leche (*biofarming*) o para mejorar tasas de crecimiento en acuicultura.

Construcción de genotecas

Las genotecas son colecciones de clones que representan el contenido genético total de un organismo o tejido en un momento dado. Las genotecas genómicas contienen fragmentos de todo el genoma, incluyendo intrones y regiones intergénicas. Se construye digiriendo el ADN total con enzimas de restricción. Las genotecas de ADNc se sintetizan a partir del ARN mensajero (ARNm) mediante la enzima transcriptasa reversa. Solo contiene las secuencias expresadas (exones), ideales para estudiar perfiles de expresión específicos de un tejido.

El proceso de cribado o *screening* se realiza para la búsqueda de un clon específico mediante hibridación con sondas marcadas o mediante ensayos inmunológicos si el vector es de expresión.

Terapias génicas

La terapia génica consiste en la inserción de genes funcionales en las células de un individuo para corregir un defecto genético o dotar a las células de una nueva función terapéutica. La estrategia *ex vivo* es el procedimiento donde las células del paciente se extraen, se modifican en el laboratorio y se reintroducen (p. ej., terapias CAR-T para cáncer).

En la estrategia *in vivo*, el vector terapéutico se administra directamente al paciente (p. ej., aerosoles para fibrosis quística). La respuesta inmunológica del paciente al vector y la inserción aleatoria en el genoma (que podría causar mutagénesis insercional) son los principales obstáculos técnicos.

Consideraciones jurídicas, legales y bioéticas

El avance de la biotecnología ha obligado a la creación de marcos regulatorios estrictos.

Dentro del marco de la propiedad intelectual, las patentes biotecnológicas protegen las invenciones, pero generan debates sobre el acceso a los recursos genéticos y el costo de las semillas o medicamentos.

La bioseguridad contempla protocolos que garantizan que los OGM no representen un riesgo para la salud humana o el medio ambiente (p. ej., Protocolo de Cartagena). La bioética es una rama de la ética aplicada que surge como respuesta a la necesidad de regular y reflexionar sobre los dilemas morales que plantean los avances de las ciencias de la vida y la salud. Su objetivo no es frenar el progreso científico, sino asegurar que este se desarrolle con respeto a la dignidad humana y al medio ambiente. En este contexto, la edición de la línea germinal humana (heredable) está prohibida en la mayoría de las legislaciones debido a las implicaciones éticas de modificar el patrimonio genético de futuras generaciones.

MARCADORES MOLECULARES

Los marcadores moleculares emergen como una de las herramientas más potentes y versátiles. Un marcador molecular es una secuencia específica de ADN que puede ser identificada y cuya ubicación en el genoma es conocida, permitiendo rastrear la herencia de un rasgo particular o identificar variabilidad genética entre individuos. La biotecnología establece el marco de aplicación (p. ej., mejoramiento vegetal, medicina personalizada o biorremediación); mientras que la biología molecular aporta las herramientas técnicas para acceder a la información genética; y los marcadores moleculares funcionan como las "etiquetas" informativas que permiten tomar decisiones precisas dentro de los procesos biotecnológicos.

Los marcadores moleculares se definen como cualquier fenotipo molecular proveniente de un gen que se expresa o de un segmento específico de ADN (correspondiente a regiones del genoma que pueden expresarse o no). Los marcadores moleculares constituyen variantes detectables de secuencias nucleotídicas o productos génicos que permiten discriminar genotipos debido a su capacidad para revelar polimorfismos heredables. Estos pueden derivar de fenotipos proteicos, como isoenzimas o antígenos, y de fragmentos específicos de ADN, cuya secuencia difiere entre individuos y permite su utilización para el análisis de diversidad, relaciones genéticas o identificación de loci asociados a caracteres de interés.

Cuando se trata de segmentos específicos de ADN cuya secuencia básica difiere para diferentes genotipos y permite diferenciarlos, se los denomina marcadores moleculares genéticos o marcadores de ADN. Un marcador molecular monomórfico es invariable en todos los organismos estudiados, pero cuando presenta diferencias en el peso molecular, actividad enzimática, estructura o sitios de restricción, se dice que es polimórfico.

En genética cuantitativa, la mayor parte de los caracteres agronómicos relevantes presentan una herencia poligénica, cuantitativa y compleja, influida por múltiples loci cuyos efectos agregados determinan la variación fenotípica (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Estos loci son denominados loci controladores de una característica cuantitativa (QTL, del inglés *Quantitative Trait Loci*). Los QTL pueden ser mapeados mediante marcadores moleculares distribuidos a lo largo del genoma. Los mapas genéticos basados en marcadores moleculares ofrecen así una plataforma robusta para describir la arquitectura genética de los rasgos cuantitativos, identificar, mapear y estimar los efectos de cada QTL y facilitar su utilización en programas de selección y recombinación genética.

Los marcadores moleculares se han consolidado como herramientas fundamentales en conservación genética, análisis de estructura poblacional, estudios evolutivos, genotipificación, identificación de híbridos y parentesco (*fingerprinting*), diagnóstico molecular y selección asistida por marcadores. En este último caso, la utilidad del marcador depende de su ligamiento estrecho con el gen o región genómica que controla el fenotipo objetivo, como la resistencia a enfermedades o la tolerancia al estrés abiótico. El uso de los marcadores moleculares acelera los programas de mejoramiento genético ya que pueden suplantar los marcadores morfológicos y fenotípicos en especial cuando la característica es altamente inestable, difícil de observar o aparece tardíamente en el desarrollo del organismo. Por su parte, las isoenzimas constituyen un método clásico y de bajo costo para estimar diversidad genética, aunque su poder

discriminatorio es limitado por el número finito de loci expresados y por el hecho de que solo informan sobre variantes genéticas que producen productos proteicos detectables.

En este contexto, la introducción de marcadores basados en ADN superó estas limitaciones al permitir explorar regiones codificantes y no codificantes, con un número prácticamente ilimitado de loci potenciales, y ha servido como instrumento para estudiar la variación en las regiones codificantes, no codificantes y altamente variables de los genomas nucleares y de orgánulos. En la **Tabla 7.1** se resumen los marcadores moleculares genéticos más usados.

Tabla 7.1. Características generales de los marcadores genéticos

| Tipo | Naturaleza | Nivel polimorfismo | Codominancia/ dominancia | Reproducibilidad | Complejidad técnica | Aplicaciones típicas |
|-------------------------------------|---|--|--------------------------|--------------------------------------|--|--|
| RFLP y PCR-RFLP | Variación en la longitud de los fragmentos generados por digestión con enzimas de restricción | Medio-alto | Codominante | Muy alta | Alta para RFLP baja para PCR-RFLP | Estudios de diversidad genética, mapas de ligamiento, análisis poblacionales, identificación de cultivares |
| RAPD | Amplificación aleatoria de regiones del genoma por cebadores arbitrarios | Bajo-medio | Dominante | Baja (sensible a condiciones de PCR) | Muy baja (técnica rápida y simple) | <i>Screening</i> preliminar, análisis exploratorios, estudios de variabilidad en organismos sin información genómica |
| SNP | Cambio puntual de un nucleótido | Bajo por locus, muy alto por número total en el genoma | Codominante | Muy alta | Variable (desde PCR convencional a plataformas de genotipificación masiva) | Genómica comparativa, selección asistida, estudios de asociación, medicina personalizada |
| VNTR | Repeticiones en tándem de unidades de 10–60 pb | Muy alto | Codominante | Alta | Media-alta | Perfiles genéticos forenses, estudios de parentesco, análisis de diversidad |
| SSR o SRT | Repeticiones cortas de 1–6 pb | Muy alto | Codominante | Alta | Media (PCR específica y electroforesis de alta resolución) | Mapas genéticos, análisis de variabilidad poblacional, identificación individual y de cultivares |

RFLP: Polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción; RAPD: ADN polimórfico amplificado al azar; SNP: Polimorfismos de nucleótido simple; VNTR: Número variable de repeticiones en tándem; SSR: Secuencias simples repetidas; STR: Secuencias que se repiten en tándem.

Polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción (RFLP)

El polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción (RFLP, del inglés *Restriction Fragment Length Polymorphisms*) constituye uno de los primeros métodos de genética molecular desarrollados para detectar variación heredable en los genomas. La técnica RFLP es un método de biología molecular que permite detectar variaciones en la secuencia de ADN a partir de diferencias en la longitud de los fragmentos generados por enzimas de restricción. En primer lugar, se extrae el ADN genómico del organismo de estudio y luego se somete a digestión con una o más enzimas de restricción, las cuales reconocen y cortan secuencias específicas. Las variaciones en la secuencia de ADN, como mutaciones o inserciones/deleciones, pueden modificar los sitios de corte, originando fragmentos de diferente tamaño entre los individuos. Posteriormente, los fragmentos obtenidos se separan mediante electroforesis en gel de poliacrilamida, generando un patrón de bandas característico. En el RFLP clásico, estos fragmentos pueden transferirse a una membrana mediante la técnica de Southern blot e hibridarse con una sonda marcada, la cual se une a la secuencia de interés, lo que permite identificar de manera codominante los alelos presentes en un locus. Finalmente, las bandas detectadas permiten comparar genotipos, analizar la variabilidad genética, identificar organismos y establecer relaciones genéticas entre muestras (**Figura 7.1a**). Los RFLP se heredan en forma mendeliana simple, y si la sonda empleada representa una copia única, esta es considerada como un *locus* y las variaciones en patrones son analizadas como alelos (bialélicos o multialélicos). La expresión de estos marcadores es codominante, es decir, todas las formas alélicas de la secuencia o del gen son distinguibles, permitiendo detectar los heterocigotos y también estudiar el flujo de genes entre poblaciones (**Figura 7.1b**). El nivel de polimorfismo que esta técnica puede detectar depende en gran medida de la naturaleza de las sondas empleadas, enzimas de restricción utilizadas y de la complejidad en cuanto al tamaño del genoma de la especie en estudio.

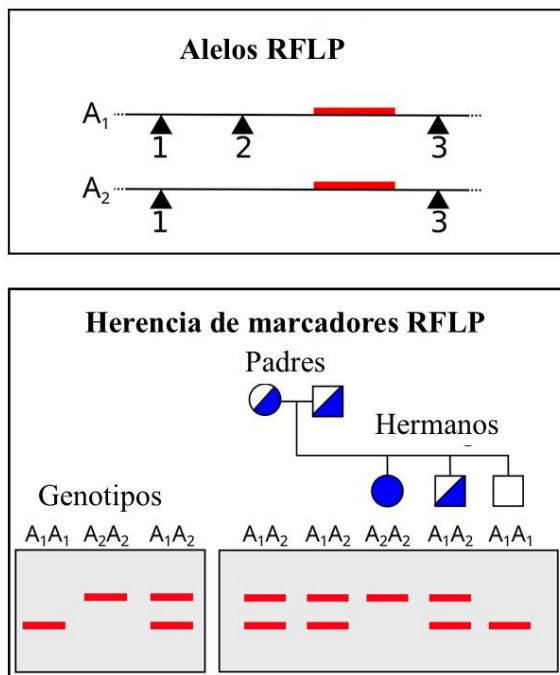


Figura 7.1. Marcadores RFLP a) **Alelos RFLP.** Cromosomas homólogos con los sitios de restricción indicados mediante triángulos. El rectángulo ubicado sobre los cromosomas corresponde al locus reconocido por la sonda. b) **Herencia mendeliana de marcadores RFLP.** Dado que las personas son 2N, tienen pares de cromosomas homólogos con los mismos loci. Sin embargo, estos loci pueden contener alelos diferentes. En este caso, el fenotipo de estos alelos es la secuencia real que puede o no contener sitios de restricción. Tomado de Biology OER con modificaciones.

Los RFLP permiten estudiar el genoma con una mayor cobertura al incluir secuencias codificadoras y no-codificadoras del ADN (exones e intrones). Esto permite detectar con mayor eficiencia cambios genéticos puntuales, en comparación con las proteínas. Las principales ventajas de los RFLP radican en la presencia de un número ilimitado de ellos, a su alta reproducibilidad, no presentan efectos pleiotrópicos, y no se ven afectados por condiciones ambientales o por el estado fisiológico del organismo.

La técnica RFLP ha sido fundamental para la construcción de mapas genéticos, el análisis de diversidad, la identificación de individuos y cultivares, y la detección de variación en genomas nucleares y de organelas. Aunque actualmente ha sido desplazado por metodologías de mayor rendimiento, el RFLP continúa siendo un referente histórico y conceptual en el estudio de la variabilidad genómica.

El uso de los RFLP en plantas representa una buena alternativa para realizar diversos estudios relacionados con los tres genomas que existen en ellas, el nuclear (ADNn), el mitocondrial (ADNmt) y el de cloroplasto (ADNcp). La aplicación de esta técnica ha sido de gran utilidad en estudios filogenéticos, diversidad genética e identificación de cultivares con propósitos de protección varietal. El uso de uno u otro genoma dependerá de los propósitos del estudio. El ADN nuclear ha sido mayormente usado para estudios de diversidad genética de individuos emparentados por su mayor tasa de mutación en comparación con el ADN mitocondrial y cloroplástico. Por lo contrario, el ADNmt ha sido usado mayormente en estudios de filogenia en animales.

PCR-RFLP

La técnica PCR-RFLP combina la amplificación específica de una región de ADN mediante PCR con la digestión enzimática con enzimas de restricción, permitiendo detectar variaciones en la secuencia de dicho fragmento.

En primer lugar, se extrae el ADN genómico de la muestra y se selecciona una región específica a amplificar utilizando cebadores (*primers*) diseñados para dicha secuencia. Mediante la PCR, se obtiene un gran número de copias del fragmento de interés (**Figura 7.2**).

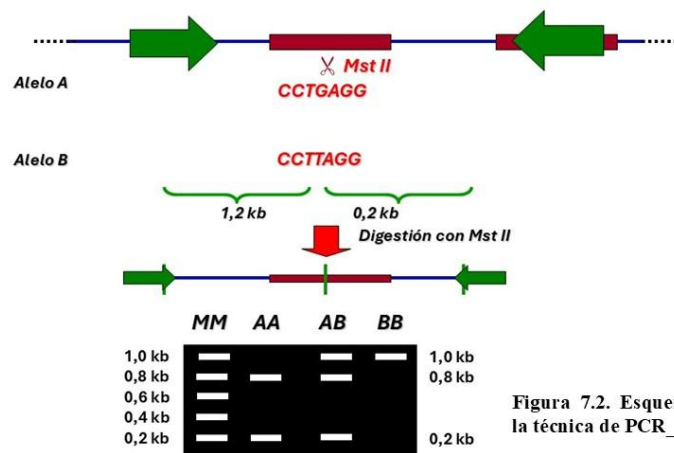


Figura 7.2. Esquema general de la técnica de PCR_RFLP.

Posteriormente, el producto de PCR se somete a digestión con una o más enzimas de restricción, que cortan el ADN en sitios específicos. Si existen mutaciones, inserciones o deleciones en la secuencia, los sitios de corte pueden estar presentes o ausentes, generando fragmentos de diferente longitud.

Finalmente, los fragmentos obtenidos se separan mediante electroforesis en gel de agarosa, observándose un patrón de bandas característico, que permite identificar polimorfismos, diferenciar individuos, cepas o especies, y analizar la variabilidad genética.

El RFLP clásico y el PCR-RFLP se basan en el mismo principio: la detección de polimorfismos a partir de diferencias en la longitud de fragmentos generados por enzimas de restricción; sin embargo, mientras que el RFLP tradicional requiere grandes cantidades de ADN genómico y, en muchos casos, la aplicación de Southern blot e hibridación con sondas marcadas, el PCR-RFLP incorpora una etapa previa de amplificación específica por PCR de la región de interés. Esto permite trabajar con cantidades mínimas de ADN, reduce el tiempo de procesamiento y simplifica considerablemente el procedimiento experimental. Por estas razones, el PCR-RFLP resulta una alternativa más rápida, sensible, económica y fácil de

implementar en el laboratorio, manteniendo la capacidad de detectar variaciones en la secuencia de ADN.

ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD)

Se ha desarrollado una serie de técnicas basadas en la PCR, como la técnica de ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD, del inglés *Random Amplified Polymorphic DNA*). En la técnica RAPD se utilizan cebadores (*primers*) cortos y de secuencia arbitraria (generalmente de 8–12 nucleótidos), que se unen al azar en distintos sitios del ADN genómico. Cuando dos sitios de unión se encuentran a una distancia compatible y en orientación opuesta, la ADN polimerasa amplifica el fragmento comprendido entre ellos. Debido a variaciones en la secuencia del ADN entre individuos (mutaciones, inserciones, deleciones), algunos sitios de unión pueden aparecer o desaparecer, lo que genera diferencias en el patrón de bandas obtenido tras la electroforesis en gel de agarosa (**Figura 7.3**). Estos productos son polimórficos cuando se ha producido una pérdida, inserción o cambio de un solo nucleótido en la cadena molde (ADN genómico).

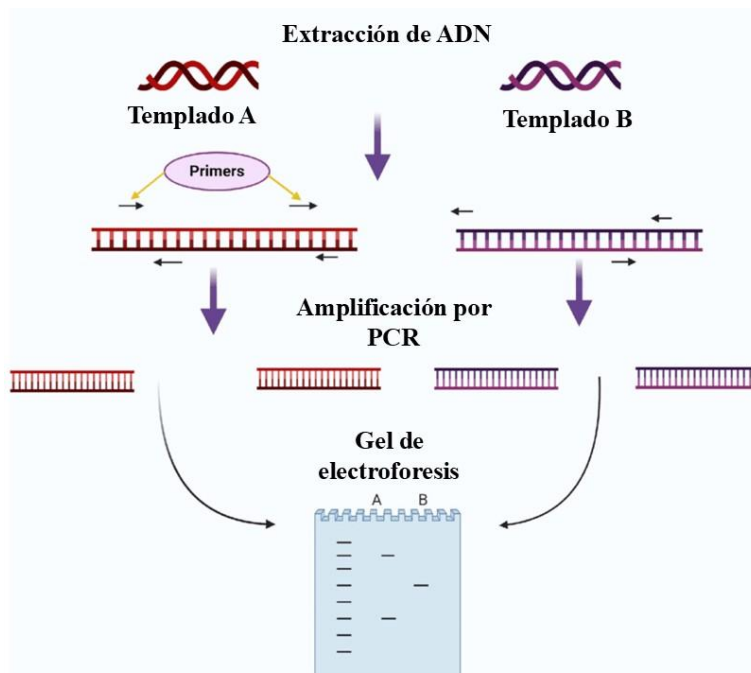


Figura 7.3. Esquema general de la técnica de RAPD. Tomado de Faizal Azizi y cols. (2021) con modificaciones.

El perfil de bandas resultante se interpreta en forma binaria (presencia/ausencia) y se utiliza para evaluar diversidad genética, diferenciar cepas, especies o poblaciones, realizar estudios filogenéticos, caracterizar variabilidad intraespecífica. Los productos de la reacción dependerán del genoma en estudio, del cebador y de las condiciones de la reacción. Los resultados de RAPD

obtenidos en plantas indican su herencia dominante, su habilidad para detectar regiones de ADN altamente variables (5-10 *loci* por cebador), su tremenda potencialidad en el mapeo de genes, identificación de razas, estudios de hibridación inter e intraespecífica y en el estudio de la variación genética en poblaciones altamente emparentadas.

Las principales ventajas de esta técnica son que no requiere información previa de la secuencia, la rapidez en la obtención de resultados, el costo, el no uso de radioactividad, menor inversión en equipos y la cantidad reducida de ADN requerida. Asimismo, los RAPD permiten detectar múltiples loci altamente variables y se han empleado en mapeo, identificación varietal y análisis de poblaciones.

Sin embargo, como desventaja aparece la baja reproducibilidad (muy sensible a condiciones de PCR). Diferentes condiciones de laboratorios con pequeñas alteraciones en los parámetros de amplificación pueden dar origen a resultados diferentes. Esta desventaja se puede reducir logrando un alto grado de estandarización de las condiciones de reacción y de amplificación, usando un control interno para asegurar la reproducibilidad de los productos de la amplificación, además del registro de las bandas nítidas y consistentes. Otra desventaja es que es un marcador dominante (no distingue heterocigotas de homocigotas).

Polimorfismo de simple nucleótido (NSP)

El polimorfismo de simple nucleótido (SNP, del inglés *Single Nucleotide Polymorphism*) representa el tipo de marcador más abundante y distribuido uniformemente en prácticamente todos los genomas eucariotas. Consisten en variaciones de un único nucleótido y constituyen marcadores bialélicos, altamente estables y de elevada reproducibilidad.

Su detección puede realizarse mediante secuenciación, microchips de hibridación, PCR aleloespecífica o tecnologías de alto rendimiento como genotipado masivo (NGS-based genotyping). Debido a su densidad y ubicuidad, los SNP son hoy la base de la genómica poblacional, los estudios de asociación genómica amplia (GWAS), la selección asistida por marcadores, la inferencia filogenética de alta resolución y la medicina de precisión. Su principal desventaja es su baja heterocigosidad individual, por su naturaleza bialélica, lo que requiere gran cantidad de loci para maximizar el poder de discriminación.

Minisatélites (VNTR) y microsatélites (SSR o STR)

Las secuencias de ADN de minisatélites (VNTR, del inglés *Variable Number of Tandem Repeats*) y microsatélites (SSR, del inglés *Simple Sequence Repeats*) son dos categorías de

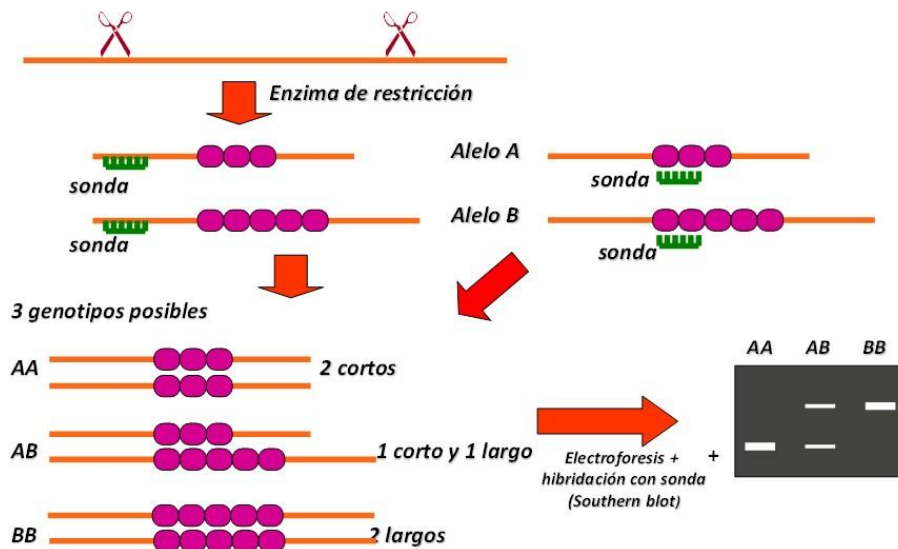


Figura 7.5. Esquema de la técnica de minisatélites.

Son marcadores multialélicos, con una capacidad discriminatoria excepcional, históricamente fundamentales en la identificación forense, pruebas de paternidad y estudios de variabilidad y diversidad genética y para realizar la identificación de individuos (*fingerprinting*) en diversas especies. Su limitación radica en la complejidad técnica, el tiempo requerido y la posibilidad de artefactos en regiones extensas con alto contenido GC.

Los SSR también son conocidos como SRT (del inglés *Short Tandem Repeats*), aunque este último término es usado predominantemente en los ámbitos de genética forense, medicina legal, identificación individual y análisis de parentesco. Los SSR están compuestos por unidades repetitivas cortas (1–6 pb) repetidas en tándem. Son extremadamente empleados debido a su altísima variabilidad, su comportamiento codominante, la simplicidad de amplificación por PCR y su distribución casi universal en los genomas. El número de repeticiones tiende a mutar por mecanismos de deslizamiento durante la replicación, lo que genera hipervariabilidad genética. Se utilizan de manera rutinaria para mapas genéticos, estudios de estructura poblacional, análisis de parentesco, genética de la conservación y selección asistida en programas de mejoramiento. Su desventaja principal reside en la posibilidad de amplificación nula (*allele dropout*) por mutaciones en los sitios de unión de los cebadores, así como la necesidad de conocer secuencias flanqueantes para su diseño.

Los SSR existen en forma abundante en plantas. Mediante los microsatélites se puede medir la diversidad entre genotipos amplificando mediante PCR la región del ADN genómico que contiene estas secuencias repetidas. En primer lugar, se extrae el ADN genómico de la

muestra. Luego, se diseñan cebadores específicos que flanquean la región donde se encuentra la repetición en tándem. Mediante PCR, se amplifica ese fragmento del ADN que contiene el STR (Figura 7.6).

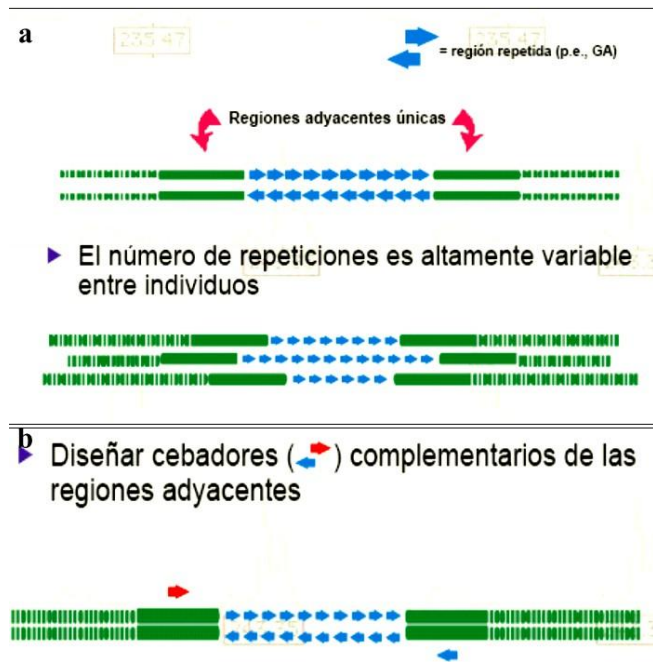


Figura 7.6. a) Estructura de un microsatélite. La técnica SSR se basa en el análisis de repeticiones cortas de ADN (1 a 6 pares de bases) dispuestas en tándem, cuyo número de repeticiones varía entre individuos. Estas secuencias están ampliamente distribuidas en el genoma y presentan un alto nivel de polimorfismo. **b)** Los cebadores se diseñan para que hibriden en las regiones aledañas al SSR, las cuales corresponden a secuencias conservadas. De esta manera, el tamaño del fragmento obtenido por PCR refleja el número de repeticiones presentes en el SSR.

Como el número de repeticiones puede variar entre individuos, el tamaño del fragmento amplificado será diferente, aun cuando los cebadores sean los mismos. Estos fragmentos se separan por electroforesis (en gel de alta resolución o electroforesis capilar), permitiendo determinar el genotipo de cada individuo según el patrón de bandas obtenido.

El uso de microsatélites ha ido aumentando mediante la producción de bibliotecas de cebadores y la secuenciación automática fluorescente que permiten el diseño de los cebadores que rodean los microsatélites. Los fragmentos generados son separados en geles de poliacrilamida desnaturizante y visualizados radioactivamente o por tinción con nitrato de plata.

Los SSR son muy atractivos para los genetistas pues combinan varias ventajas como ser su codominancia, multialelismo y alta heterocigosidad. El alto nivel de polimorfismo que detecta permite una discriminación precisa entre individuos altamente emparentados. En general, la amplificación de SSR ha demostrado que éstos son más variables que isoenzimas, RFLP, RAPD, etc. Además de ser altamente polimórficos, los microsatélites usan cantidades mínimas de ADN, equivalentes a las que se usan en RAPD. Las condiciones de amplificación

y de reacción son especie-específicas y la variación en el largo de los productos amplificados mediante PCR es función del número de unidades repetidas.

La técnica STR se utiliza principalmente para identificación genética (genética forense), estudios de parentesco, análisis de diversidad genética, estudios de estructura poblacional, genotipificación de organismos. Entre sus principales ventajas se encuentran la alta reproducibilidad, alto poder de discriminación, requiere pequeñas cantidades de ADN y es una técnica rápida y sensible.

Algunas de las desventajas de los SSR son el tiempo y el costo involucrados en el proceso del diseño de cada cebador. Sin embargo, existe la posibilidad de usar los mismos cebadores en más de una especie. Esto es debido, a que existe un grado de conservación de los microsatélites entre genomas de especies tan distantes como son algunos mamíferos, plantas anuales y perennes. Esto no es generalizado en todas las especies, puesto que, al comparar entre cereales de grano pequeño como trigo, cebada y centeno, se ha detectado una limitada conservación de las secuencias microsatélites.

Los SSR han sido también utilizados para medir la diversidad genética de diversas especies anuales como soya (*Glycine max*), arroz (*Oryza sativa*), maíz (*Zea mays*), cebada (*Hordeum vulgare*), trigo (*Triticum aestivum*) y raps (*Brassica sp.*). Hasta ahora también se han desarrollado microsatélites en especies perennes, aunque el número de ellos ha sido escaso. En el caso de *Eucaliptus* los microsatélites han sido transferidos entre poblaciones y especies del mismo género. En forma adicional, la estimación de heterocigosidad que este marcador puede entregar presenta una gran ventaja en el mapeo de QTLs.

El desarrollo de marcadores moleculares ha transformado la caracterización genética del germoplasma y ha permitido integrar enfoques morfológicos, bioquímicos y genómicos. La elección del marcador adecuado depende del objetivo del estudio, del nivel de resolución requerido y de los recursos disponibles, siendo todas estas plataformas complementarias para comprender la diversidad genética, la estructura poblacional y la base molecular de los caracteres cuantitativos.

HERRAMIENTAS BIOINFORMÁTICAS

La convergencia entre la biotecnología y las herramientas de biología molecular genera actualmente volúmenes masivos de datos crudos (Big Data), cuya interpretación sería inalcanzable sin el soporte de la bioinformática. Esta disciplina amalgama la biología, la

computación y la estadística y permite el almacenamiento, análisis y modelado de las secuencias obtenidas mediante técnicas como la secuenciación de nueva generación (NGS, del inglés *Next Generation Sequencing*). Mientras que la biología molecular proporciona el acceso físico al material genético, la bioinformática traduce esa complejidad química en información digital accionable. En el marco de la biotecnología moderna, esta integración es crucial: la bioinformática identifica patrones moleculares y predice funciones proteicas *in silico*, optimizando significativamente los tiempos de investigación y permitiendo el diseño de soluciones biotecnológicas de alta precisión, como la edición genética dirigida o la ingeniería de rutas metabólicas.

Introducción a la Bioinformática

La bioinformática es una disciplina interdisciplinaria que integra la biología molecular, matemáticas, estadística e informática para el almacenamiento, gestión, análisis e interpretación computacional de datos biológicos. Su objetivo central es transformar grandes volúmenes de información, como secuencias de ADN, ARN y proteínas, estructuras macromoleculares, perfiles de expresión génica o datos ómicos, en conocimiento biológico significativo. A través de algoritmos, bases de datos y modelos computacionales, la bioinformática permite identificar patrones evolutivos, predecir estructuras, comparar secuencias, anotar genomas, inferir funciones y simular procesos biológicos, convirtiéndose en un pilar esencial de la biología moderna, la biotecnología y la medicina de precisión.

La bioinformática puede entenderse como una extensión natural de la biología molecular hacia el ámbito computacional. Tradicionalmente, los estudios en biología se desarrollaban mediante dos enfoques experimentales principales: el trabajo *in vivo*, dentro de organismos vivos, y las aproximaciones *in vitro*, en sistemas controlados fuera del organismo. Con la irrupción de la informática, emergió un tercer modo de explorar los sistemas biológicos: el análisis *in silico*, denominado así por los chips de silicio que constituyen los microprocesadores. Este nuevo paradigma permite procesar y examinar cantidades masivas de datos biológicos con una velocidad y precisión antes inalcanzables.

Durante las últimas décadas, el extraordinario avance científico y tecnológico ha impulsado a la investigación biológica hacia una nueva era marcada por la genómica, la proteómica, la transcriptómica y, más recientemente, por la biología de sistemas y la inteligencia artificial aplicada a la biología molecular. La finalización del Proyecto Genoma Humano (2003), junto con el desarrollo de múltiples Proyectos Genoma de organismos modelo

y el surgimiento de la genómica funcional y comparada, ha generado un crecimiento exponencial en la cantidad y complejidad de los datos biológicos disponibles. A ello se suma la revolución introducida por las tecnologías NGS y por la aparición de plataformas de predicción estructural basadas en aprendizaje profundo, como AlphaFold, que transformaron radicalmente la comprensión de la relación estructura-función de las proteínas.

Toda esta información, que se actualiza día a día, se almacena, organiza y analiza a través de una gran diversidad de bases de datos y recursos bioinformáticos internacionales. Entre ellas destacan no solo los repositorios tradicionales, sino también nuevas infraestructuras como Ensembl, del *European Molecular Biology Laboratory - European Bioinformatics Institute* (EMBL-EBI), UniProtKB, InterPro, Pfam, *Protein Data Bank* (PDB), PDB-AlphaFold, *Gene Expression Omnibus* (GEO) y bases de datos de variantes como ClinVar o dbSNP. La disponibilidad abierta de estas plataformas ha modificado profundamente los modos de investigar, generando un cambio de paradigma en la biología moderna.

Este nuevo escenario exige profesionales capaces de manejar herramientas bioinformáticas básicas y avanzadas, incluyendo el acceso a bibliografía especializada, la interpretación de modelos moleculares, el empleo de programas de análisis de secuencias y la integración de datos provenientes de diferentes bases de datos ómicas. La bioinformática se ha vuelto indispensable no solo en la investigación en biología molecular y biotecnología, sino también en áreas como la medicina de precisión, la genómica evolutiva, la metagenómica ambiental y el diseño racional de fármacos.

El propósito central de la bioinformática es interpretar patrones, organizar información biológica compleja y generar modelos que expliquen el funcionamiento molecular de los organismos. Una de las preguntas que impulsan este campo es cómo genomas que no difieren sustancialmente en cantidad de genes, como ocurre entre humanos y diversas plantas, pueden dar lugar a organismos tan distintos. Esta diversidad no radica simplemente en el número de genes, sino en cómo se regulan, interactúan y se expresan. Para desentrañar estos niveles de complejidad, la computación es indispensable: permite almacenar, comparar y analizar grandes volúmenes de secuencias, estructuras y datos funcionales.

Todos los organismos vivos están formados por células y el ADN, que almacena la información genética, está constituido por dos hebras antiparalelas complementarias. Esta característica introduce una ambigüedad inherente al representar una secuencia: incluso siguiendo la convención de leer de 5' a 3', una misma molécula puede describirse mediante la

hebra superior o la hebra inferior. Ambas representaciones son válidas, dado que cada una corresponde a secuencias diferentes pero complementarias. Por esta razón, muchas herramientas bioinformáticas consideran automáticamente ambas hebras al realizar búsquedas y comparaciones, garantizando resultados completos y evitando interpretaciones parciales. No todas las plataformas realizan este análisis dual de manera automática; algunas procesan únicamente la secuencia ingresada por el usuario, lo que exige especial atención en la preparación de los datos de entrada.

En paralelo, el acceso a estructuras cristalográficas y modelos tridimensionales ha avanzado gracias a bases como el PDB y a recursos recientes como el *AlphaFold Protein Structure Database*, que proporciona modelos de alta precisión para prácticamente todo el proteoma de miles de especies. Esto permite analizar interacciones proteína–proteína y proteína–ADN utilizando tanto herramientas clásicas como RasMol, PyMOL o UCSF Chimera, como aplicaciones de nueva generación que integran simulaciones dinámicas y predicciones de complejos macromoleculares.

En la **Tabla 7.2** se resumen las principales bases de datos disponibles para ácidos nucleicos y proteínas.

Tabla 7.2. Principales bases de datos, servidores y programas disponibles para ácidos nucleicos y proteínas.

| Bases de datos, herramientas y repositorios bioinformáticos integrales | | |
|---|--|---|
| Recurso | Tipo | Finalidad principal |
| NCBI | Centro integrador de bases de datos y herramientas bioinformáticas | Organismo de referencia que administra múltiples repositorios biológicos (GenBank, RefSeq, entre otros) y ofrece herramientas de análisis como BLAST, ORFfinder y Genome Data Viewer. Su misión es integrar información genómica, proteómica y bibliográfica para facilitar la investigación biomédica. |
| PubMed | Base de datos bibliográfica biomédica | Motor de búsqueda que integra millones de referencias científicas provenientes de MEDLINE, revistas biomédicas especializadas y repositorios del NLM. Facilita el acceso a literatura primaria y revisiones en biomedicina, bioquímica, biotecnología y ciencias afines, ofreciendo herramientas de filtrado, vinculación con artículos completos y análisis bibliométrico. |
| BLAST | Herramienta de alineamiento local | Algoritmo fundamental para comparar secuencias nucleotídicas o proteicas contra bases de datos extensas, identificando homologías, regiones conservadas, posibles ortólogos y funciones putativas mediante alineamientos locales de alta eficiencia computacional. |

Bases de datos, repositorios, programas bioinformáticos de nucleótidos y relacionados

| | | |
|---|--|--|
| GenBank | Base de datos de secuencias | Repositorio abierto del NCBI que almacena secuencias de ADN, ARN y proteínas con anotaciones biológicas exhaustivas y enlaces a literatura y organismos relacionados. |
| Ensembl | Base de datos genómica | Plataforma de análisis comparativo de genomas eucariotas que provee anotaciones estructurales, variantes, ortología y herramientas de exploración genómica integradas. |
| DDBJ | Base de datos de secuencia | Componente asiático de la <i>International Nucleotide Sequence Database Collaboration</i> . Almacena secuencias nucleotídicas depositadas globalmente con estándares curatoriales compartidos con GenBank y EMBL-EBI. |
| Primer3 | Programa de diseño de oligonucleótidos | Herramienta ampliamente utilizada para el diseño automatizado de primers para PCR, secuenciación y qPCR, aplicando parámetros termodinámicos y estructurales. |
| NEBcutter | Servidor de análisis de restricción | Analiza secuencias y predice sitios de corte de enzimas de restricción, generando mapas de digestión para planificación experimental. |
| Bases de datos, servidores y recursos de proteínas | | |
| ExPASy | Servidor bioinformático proteico | Plataforma del SIB que integra herramientas para análisis de secuencias, proteómica, estructura, dominios, modificaciones postraduccionales y modelado. |
| UniProt | Base de datos integradora de proteínas | Repositorio global que unifica información proteica curada (Swiss-Prot) y no curada, proporciona anotaciones detalladas sobre funciones, dominios, isoformas, PTMs, localización subcelular, variantes y evidencias experimentales. Referencia completa y estandarizada de la biología proteica a nivel molecular y comparativo. |
| InterPro | Base de datos integradora de familias y dominios proteicos | Plataforma que combina múltiples bases de datos especializadas (Pfam, PROSITE, PRINTS, SMART, TIGRFAMs, entre otras) para generar un marco unificado que permite identificar dominios, firmas funcionales, arquitecturas modulares y relaciones evolutivas. Facilita la anotación funcional al integrar modelos HMM, patrones y perfiles curatoriales en un único recurso coherente. |
| PDB | Base de datos de estructuras proteicas | Archivo global de estructuras tridimensionales de biomoléculas obtenidas por cristalografía, RMN o criomicroscopía electrónica. |
| Pfam | Base de datos de familias proteicas | Colección de familias proteicas definidas por modelos ocultos de Markov (HMM) que permiten identificar dominios evolutivamente conservados. |
| Rasmol | Programa de visualización | Visualizador molecular ligero que permite examinar estructuras tridimensionales de proteínas y ácidos nucleicos provenientes de PDB. |
| GOR | Método de predicción secundaria | Algoritmo bioinformático que predice elementos de estructura secundaria proteica (hélices, láminas, giros) empleando principios de propensión y teoría de información |
| AlphaFold | Sistema de predicción estructural | Modelo de IA desarrollado por DeepMind que infiere estructuras tridimensionales de proteínas con precisión cuasi-experimental a partir de secuencias. |

Esta red de recursos bioinformáticos redefine la forma en que estudiamos, interpretamos y aplicamos la información biológica. La posibilidad de integrar datos ómicos, estructurales y

evolutivos constituye hoy un requisito central para cualquier formación moderna en biología molecular, bioquímica y biotecnología.

BASES DE DATOS Y REPOSITORIOS BIOINFORMÁTICOS INTEGRALES

Introducción al NCBI

El NCBI constituye uno de los repositorios bioinformáticos más relevantes para las ciencias biológicas contemporáneas. Su infraestructura integra una amplia variedad de bases de datos públicas que abarcan secuencias de ADN y ARN, proteínas, estructuras tridimensionales, anotaciones funcionales, información taxonómica, registros clínicos y bibliografía científica.

Dentro del ecosistema de las bases de datos y plataformas bioinformáticas, el NCBI continúa siendo un nodo central, ya que proporciona acceso integrado a las principales bases de datos bibliográficas (PubMed), genómicas (GenBank), proteicas (RefSeq, Protein), estructurales y de variación genética. Su interfaz permite la navegación multiescala de genomas mediante Genome Data Viewer, además del acceso directo a herramientas fundamentales como la herramienta de búsqueda básica de alineamiento local (BLAST, del inglés *Basic Local Alignment Search Tool*), que posibilita identificar, comparar y contextualizar secuencias de ADN, ARN o proteínas frente a millones de entradas depositadas en repositorios públicos. Los mapas virtuales proporcionados por NCBI permiten cruzar información genómica con datos de STS, SNP, genes adyacentes, elementos regulatorios y anotaciones funcionales actualizadas.

La creciente necesidad de aprovechar esta información para aplicaciones tecnológicas o experimentales ha impulsado el desarrollo de herramientas específicas, como *Primer3* o NCBI Primer-BLAST, que facilitan el diseño detallado de cebadores y sondas para amplificación o detección por hibridación. Estas herramientas son fundamentales en el trabajo molecular cotidiano y permiten trasladar rápidamente la información disponible en bases de datos al diseño experimental.

Utilizar el NCBI para introducirse a la bioinformática resulta muy importante e útil ya que se accede a múltiples plataformas pudiendo explorarlas y desarrollar competencias esenciales para la interpretación y análisis de secuencias, la búsqueda de homologías y la comprensión de los procesos de anotación genómica y proteómica.

Fundamento teórico del uso del NCBI

El aprovechamiento de las herramientas del NCBI en el trabajo práctico se sustenta en principios teóricos propios de la biología computacional y la genómica comparada. La

disponibilidad masiva de secuencias en bases de datos como GenBank y Referencia de secuencias controladas por NCBI (RefSeq) permite realizar búsquedas basadas en similitud mediante algoritmos como BLAST, cuya lógica se fundamenta en la identificación de alineamientos locales que revelan relaciones evolutivas, funcionales o estructurales entre moléculas. La anotación de secuencias que ofrece RefSeq proporciona información curada y estandarizada, indispensable para la validación de identidades proteicas o génicas y para la interpretación de variantes o mutaciones. Asimismo, la integración entre las distintas bases de datos del NCBI posibilita el análisis multidimensional: desde el reconocimiento taxonómico del organismo de origen hasta la inferencia estructural o funcional de la proteína codificada. Comprender estos fundamentos permite no solo ejecutar procedimientos bioinformáticos, sino también interpretar críticamente los resultados obtenidos, evaluar la calidad de los alineamientos, distinguir entre anotaciones experimentales y computacionales y estimar la significancia estadística de las comparaciones mediante parámetros como el valor E o la identidad porcentual. En este sentido, el valor E representa el número esperado de alineamientos con una puntuación equivalente o superior que podrían encontrarse por azar en una base de datos de determinado tamaño. Cuanto más bajo es su valor, mayor es la significancia estadística del alineamiento y, por lo tanto, mayor es la probabilidad de que exista una relación biológica real entre las secuencias comparadas.

- Valor E bajo (por ejemplo, $1e-50$, $1e-20$, $1e-5$) → alineamiento altamente significativo.
- Valor E cercano a 1 o mayor → coincidencia probablemente aleatoria.

Depende del tamaño de la base de datos: bases más grandes tienden a dar valores E más altos para el mismo puntaje de alineamiento.

La identidad porcentual corresponde al porcentaje de posiciones del alineamiento en las cuales los residuos son idénticos entre la secuencia de consulta y la secuencia de la base de datos. Este parámetro permite estimar el grado de similitud directa entre ambas secuencias y, en conjunto con el valor E y la cobertura del alineamiento, aporta una medida más completa de la confiabilidad de la asignación funcional o taxonómica.

Puntos para remarcar:

- Alta identidad ($\geq 90-95\%$) → muy probablemente la misma proteína/gene o uno muy estrechamente relacionado.
- Identidad intermedia ($40-70\%$) → posible homología, pero requiere análisis adicional.

- Identidad baja (<30%) → similitud débil o no significativa, salvo en regiones altamente conservadas.
- La identidad no siempre implica la misma función, especialmente en familias grandes de proteínas.

Comprender estos fundamentos no solo permite ejecutar procedimientos bioinformáticos, sino también interpretar críticamente los resultados obtenidos, evaluar la calidad de los alineamientos, distinguir entre anotaciones experimentales y computacionales y estimar la significancia estadística de las comparaciones mediante parámetros como el valor E, que representa el número esperado de coincidencias obtenidas al azar en una base de datos determinada (cuanto menor es su valor, mayor es la significancia del alineamiento), y la identidad porcentual, que indica la proporción de residuos idénticos entre las secuencias comparadas dentro de la región alineada, aportando en conjunto una medida robusta de la confiabilidad de la asignación funcional o taxonómica.

La biblioteca científica de NCBI: PubMed

Existen múltiples estrategias para iniciar un proceso de investigación en Biología Molecular empleando herramientas bioinformáticas. Uno de los enfoques más intuitivos y fundamentales consiste en comenzar por la búsqueda bibliográfica, especialmente cuando se dispone solo del nombre de un gen, una proteína, un locus genómico o incluso un concepto parcialmente definido. En estos casos, la indagación inicial debe orientarse hacia bases de datos que permitan acceder a literatura validada y actualizada.

En este contexto, uno de los recursos centrales del NCBI es PubMed, una plataforma que constituye la puerta de entrada al vasto ecosistema de información biomédica administrado por la *National Library of Medicine* (NLM). PubMed se ha consolidado como una de las bibliotecas científicas digitales más importantes del mundo, ya que integra referencias y resúmenes de millones de publicaciones revisadas por pares, así como manuscritos en acceso abierto provenientes de PubMed Central (PMC). Además, incorpora herramientas de minería de texto, enlaces automáticos a bases de datos moleculares y filtros avanzados para mejorar la recuperación de información relevante.

El acceso a PubMed puede realizarse mediante sus URL oficiales:

- www.pubmed.com
- www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed

Ambas direcciones conducen a una interfaz renovada, diseñada bajo los principios de usabilidad y descubrimiento guiado, donde se destaca el logotipo de la herramienta y una barra de búsqueda potenciada por algoritmos de aprendizaje automático (*Best Match*), capaces de priorizar artículos clave según el contexto de la consulta. PubMed también permite explorar tendencias científicas mediante funciones como “Similar Articles”, “Cited By”, y enlaces directos a bases de datos como Gene, Protein, ClinVar, MeSH y PMC, lo que facilita una integración inmediata entre información bibliográfica, datos genómicos y anotaciones funcionales.

Así, PubMed no solo es un punto de partida para cualquier investigación en biología molecular, sino también una plataforma que promueve el acceso abierto, el análisis crítico de la literatura científica y la articulación con otras herramientas bioinformáticas esenciales.

Herramientas de alineamiento para la comparación de secuencias

En principio funcionan contrastando la secuencia *query* (secuencia insertada incógnita) contra los datos cargados en las bases, de esta forma se calcula un score según el algoritmo con el que se trabaje. El *score* del alineamiento es la suma de los *scores* individuales de cada posición de la secuencia que está comparando; el mismo se define posición por posición. Habitualmente, durante el alineamiento puede insertarse un *gap* (espacio sin alineamiento) que biológicamente puede ser interpretado como una delección en la secuencia donde se introduce el *gap* y una inserción en la secuencia alineada. Esto es un evento INDEL. Un *gap* se penaliza de alguna manera (por ejemplo, se resta al *score* del alineamiento), ya que, de otra forma, el alineamiento óptimo tendría una enorme cantidad de pequeños *gaps*, lo cual es incompatible con una interpretación biológica.

- Penalización de apertura del *gap* (*gap opening penalty*)
- Penalización de la extensión del *gap* (*gap extension penalty*)

Puede haber 2 tipos de alineamientos (**Figura 7.7**):

Los alineamientos globales, que intentan alinear cada residuo de cada secuencia, son más útiles cuando las secuencias problema iniciales son similares y aproximadamente del mismo tamaño (no quiere decir que los alineamientos globales no puedan terminar en huecos). Una estrategia general de alineamiento global es el algoritmo Needleman-Wunsch.

Los alineamientos locales son más útiles para secuencias diferenciadas en las que se sospecha que existen regiones muy similares o motivos de secuencias similares dentro de un

contexto mayor. El algoritmo Smith-Waterman es un método general de alineamiento local basado en programación dinámica.

```
Global FTFTALILLAVAV
      F--TAL--LLA-AV

Local  FTFTALILL-AVAV
      --FTAL--LLAAV--
```

Figura 7.7. Alineamiento global y local. El alineamiento global intenta alinear cada residuo de cada secuencia, útil cuando las secuencias problema iniciales son similares y aproximadamente del mismo tamaño. El alineamiento local es más útil para secuencias diferenciadas en las que se sospecha que existen regiones muy similares dentro de un contexto mayor.

La herramienta bioinformática más usada del NCBI: BLAST

La familia BLAST constituye una de las herramientas bioinformáticas de métodos de búsqueda y proporciona varios algoritmos optimizados para tipos particulares de problemas, tales como la búsqueda de coincidencias entre secuencias escasamente relacionadas.

Desarrollado por el NCBI, BLAST permite comparar secuencias de ADN, ARN o proteínas contra bases de datos biológicas, con el propósito de identificar similitudes evolutivas, estructurales o funcionales. Su relevancia radica en que el análisis comparativo de secuencias es un principio central de la genómica y la proteómica moderna debido a que organismos que comparten regiones homólogas suelen conservar funciones, estructuras tridimensionales o mecanismos regulatorios análogos. De este modo, la herramienta se convierte en un puente entre la información primaria de una secuencia y su interpretación biológica.

A diferencia de los algoritmos de alineamiento global clásicos, BLAST implementa un enfoque heurístico que prioriza la identificación rápida de “palabras” o patrones cortos coincidentes entre la secuencia *query* y las secuencias almacenadas en bases de datos. Utiliza una palabra de búsqueda de longitud “k”, pero sólo evalúa las coincidencias más significativas de las palabras, en lugar de cada coincidencia como hacen otros programas. Se identifica una palabra con el máximo *score*, y luego se extiende en ambas direcciones, se recalcula el *score*, si es mayor se continúa extendiendo. Estos son alineamientos de secuencia por métodos de comparación de ventanas que requiere gran capacidad de memoria y gran capacidad de almacenamiento. Entonces, el tiempo de computación se incrementa de forma cuadrática en función de la longitud de la secuencia.

BLAST, además, incorpora modelos probabilísticos que permiten calcular parámetros estadísticos clave, como el valor E y el de similitud. El valor E expresa la probabilidad de que un alineamiento de calidad equivalente surja por azar dada la magnitud de la base de datos explorada. Este parámetro confiere rigor estadístico al análisis comparativo y permite

discriminar similitudes significativas de coincidencias fortuitas, ya que describe el número de *hits* que uno puede esperar por azar cuando busca en una base de datos de una medida particular. Un valor $E = 1$ es el valor que uno espera si se realiza un *match* con un *score* similar simplemente por azar. Un valor $E = 0$ es el *match* más significativo. El valor E tiene en cuenta el largo de la secuencia *query*. Esto decrece exponencialmente con el *score* que es asignado para un *match* entre 2 secuencias. De aquí se depende el valor de similitud otorgado al alineamiento; esto dependerá de la matriz utilizada por el programa de alineamiento, es decir, de los valores asignados para cada *score*. Es importante aclarar que dependiendo de la naturaleza de los aminoácidos o nucleótidos alineados se asigna un valor de *score*, si son idénticos, el valor es máximo = 1, asignando valores intermedios de acuerdo con su similitud hasta 0.

El análisis comparativo de secuencias mediante BLAST y otros programas de búsqueda y alineamiento se sustenta en el uso estandarizado del formato FASTA (**Figura 7.8**), que permite representar ácidos nucleicos y proteínas de manera uniforme y legible por los algoritmos de búsqueda.

```
> My_Sequence_Name
ARCGTCRGCKINTANDRGCKINTAND
CKINTANDARCGTCRGCKINTANDRG
CKINTAND
```

Figura 7.8. Secuencia aminoacídica en formato FASTA. La línea de salida con > es la línea de definición, seguido de un espacio y un identificador único seguido por un facultativo de breve definición. Las líneas siguientes del *enter* contienen la secuencia de ADN o de proteínas hasta que el carácter siguiente > en el archivo indica el comienzo de una nueva secuencia.

Esta representación se complementa con los códigos consensuados por la *International Union of Biochemistry* (IUB) y la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC) para nucleótidos (**Tabla 7.3**) y aminoácidos (**Tabla 7.4**), que definen con precisión los símbolos canónicos como las ambigüedades biológicas posibles en cada posición. La integración de estas convenciones posibilita que BLAST interprete correctamente la variabilidad molecular, optimizando la alineación, la identificación de homologías y la inferencia funcional a partir de secuencias provenientes de diversas bases de datos internacionales.

Tabla 7.3. Código consensuado por la IUB–IUPAC para los nucleótidos. Las tablas muestran sólo los de uso más frecuente.

| Código del nucleótido | Categoría del código | Nombre |
|-----------------------|----------------------|---------------|
| A | Purina | Adenina |
| C | Pirimidina | Citosina |
| G | Purina | Guanina |
| T | pirimidina | Timina |
| N/X | Cualquier nucleótido | G o A o C o T |
| R | Purina | A o G |
| Y | Pirimidina | C o T |
| - | Ninguno | ---- (gap) |
| W | Purina y pirimidina | A o T |
| S | Purina y pirimidina | C o G |

Tabla 7.4. Código consensuado por la IUB–IUPAC para los aminoácidos.

| Código del aminoácido | Código de tres letras | Aminoácido |
|-----------------------|-----------------------|-----------------|
| A | Ala | Alanina |
| C | Cys | Cisteína |
| D | Asp | Ácido aspártico |
| E | Glu | Glutamina |
| F | Phe | Fenilalanina |
| G | Gly | Glicina |
| H | His | Histidina |
| I | Ile | Isoleucina |
| K | Lys | Lisina |
| L | Leu | Leucina |
| M | Met | Metionina |
| N | Asn | Asparagina |
| P | Pro | Prolina |
| Q | Gln | Glutamina |
| R | Arg | Arginina |
| S | Ser | Serina |
| T | Thr | Treonina |
| V | Val | Valina |
| W | Trp | Triptófano |
| Y | Tyr | Tirosina |

BASES DE DATOS, REPOSITORIOS, PROGRAMAS BIOINFORMÁTICOS DE NUCLEÓTIDOS Y RELACIONADOS

La base de datos de secuencias genéticas del NCBI: GenBank

GenBank es una base de datos pública internacional de secuencias genéticas, administrada por el NCBI. Constituye uno de los repositorios más completos y utilizados a nivel mundial para almacenar y distribuir secuencias de ADN, ARN y proteínas, junto con anotaciones biológicas asociadas. Recibe directamente las secuencias depositadas por investigadores, laboratorios, centros de secuenciación y grandes consorcios genómicos. Cada registro enviado representa un fragmento de información biológica que queda disponible de forma abierta para toda la comunidad científica. Es una base de datos gratuita y se actualiza diariamente. El NCBI implementa controles automáticos y manuales para corregir redundancias, mejorar anotaciones y mantener la consistencia del sistema.

GenBank forma parte de la *International Nucleotide Sequence Database Collaboration* (INSDC), junto con EMBL-EBI (Europa) y DBJ (Japón). Estas tres instituciones comparten información diariamente, garantizando que los datos depositados en cualquiera de ellas se sincronicen y estén disponibles globalmente. A través del entorno NCBI, GenBank se integra con otras herramientas como BLAST, GEO (expresión génica), SRA (Sequence Read Archive, lecturas crudas de secuenciación masiva), RefSeq (colección curada) y *Genome Data Viewer* (visualización genómica). Gracias a ello, GenBank permite trazar la evolución y diversidad genética de organismos, recuperar secuencias para diseño experimental (clonación, primers, síntesis génica), realizar análisis comparativos, anotación funcional y estudios filogenéticos.

Cada entrada en GenBank incluye la secuencia propiamente dicha e información de anotación:

- **Locus:** es el primer nombre alfanumérico informado. El resto de la línea dice los pares de bases del ADN lineal y la fecha de la última actualización.
- **Definición:** indica el nombre otorgado a los nucleótidos encontrados, es decir, a qué gen o parte del gen y organismo al que pertenecen.
- **Versión:** el número de acceso asignado cuando el dato entra por primera vez a la base de datos y nunca será cambiado. Además, se encuentra el número GI que rastrea las versiones de una entrada. El número después del punto del número de acceso se refiere a cuántas veces fue actualizada esta secuencia.
- El organismo, la taxonomía de la especie estudiada.
- Referencia con respecto a la secuencia buscada.

- La base de datos de nucleótidos contiene secuencias de nucleótidos, la STS (número de secuencias de sitio etiquetados), *whole genome shotgun* (WGS)
- EST: marcas de secuencias expresadas.
- GSS: secuencias reconocidas del genoma.
- referencias bibliográficas y vínculos a publicaciones

Las bases de datos de nucleótidos y proteínas incluyen RefSeqs.

Introducción a Ensembl

Ensembl es una plataforma de referencia para la genómica comparada y la anotación de genomas eucariotas. Este recurso se encuentra en EMBL-EBI. Ensembl es mantenido conjuntamente por el EMBL-EBI y el *Sanger Institute*. Está diseñado para anotar genomas completos, principalmente de vertebrados (y actualmente de diversos grupos eucariotas); proveer un navegador genómico con información integrada de genes, transcritos, variantes, regiones reguladoras, alineamientos genómicos, filogenias, anotaciones funcionales. Su interfaz permite navegar los genomas a diferentes escalas, desde cromosomas completos hasta exones individuales. Entre sus funciones principales, incluyen la visualización de genomas completos, el acceso a anotaciones automatizadas y comparativas, y la integración con herramientas como BLAST y *Variant Effect Predictor*.

En ambientes académicos, Ensembl permite que los estudiantes exploren la organización estructural de los genes, los patrones de expresión, las regiones reguladoras y la conservación evolutiva entre especies, promoviendo una comprensión integradora del genoma como unidad funcional y evolutiva.

El EMBL-EBI, por su parte, se dedica a desarrollar y mantener bases de datos públicas de secuencias, proteínas, estructuras y otros recursos ómicos y administran muchas bases de datos clave internacionalmente, como UniProt (junto con el *Swiss Institute of Bioinformatics* y el *Protein Information Resource*), InterPro y Pfam, entre otros.

Fundamento teórico del uso de Ensembl

El uso de Ensembl se fundamenta en principios de anotación genómica, predicción de transcritos y análisis evolutivo. Ensembl integra modelos computacionales que identifican exones, intrones, regiones UTR, sitios promotores y elementos reguladores, combinando información experimental y predicciones *in silico*. Su estructura permite comprender fenómenos como la existencia de múltiples isoformas, la conservación de bloques sinténicos y la dinámica evolutiva de familias génicas. Estos fundamentos son esenciales para interpretar

correctamente la relación entre secuencia, estructura génica y función biológica, y para integrar la bioinformática en el análisis molecular.

Introducción al DDBJ

El *DNA Data Bank of Japan* (DDBJ) es uno de los tres repositorios internacionales primarios dedicados al almacenamiento, gestión y distribución de secuencias nucleotídicas. Fue creado en 1986 y es administrado por el *Center for Bioscience and Biotechnology* del *National Institute of Genetics* (NIG) en Mishima, Japón. Su misión principal es garantizar el acceso abierto, estandarizado y permanente a datos genómicos generados por la comunidad científica global, contribuyendo a la transparencia, reproducibilidad y avance del conocimiento en biología molecular y bioinformática.

El DDBJ forma parte del INSDC, un consorcio que integra también a GenBank (NCBI, Estados Unidos) y EMBL-EBI (Reino Unido). Esta alianza estratégica asegura la sincronización diaria de todos los registros, de modo que cualquier secuencia depositada en cualquiera de las tres bases es replicada y disponible simultáneamente en las restantes. Este mecanismo de interoperabilidad garantiza un ecosistema de datos coherente, redundante y universalmente accesible, condición esencial para la investigación comparativa y la estandarización de anotaciones genómicas.

El DDBJ se destaca por su énfasis histórico en la recepción de datos procedentes del Asia-Pacífico, particularmente de iniciativas japonesas de secuenciación en genómica microbiana, plantas, animales y humanos. Cada registro almacenado incluye la secuencia nucleotídica, metadatos experimentales, información taxonómica, referencias bibliográficas y un número de acceso único que garantiza su identificación y trazabilidad a lo largo del tiempo.

Introducción a Primer3

La PCR continúa siendo, más de cuatro décadas después de su desarrollo, una de las herramientas experimentales más versátiles y transformadoras de la biología molecular. Su irrupción redefinió la capacidad de amplificar regiones específicas del genoma con alta sensibilidad, y en la actualidad sigue siendo indispensable tanto en laboratorios de investigación básica como en plataformas de diagnóstico molecular, secuenciación masiva (NGS), estudios metagenómicos, medicina personalizada y análisis evolutivo poblacional.

Debido a la centralidad de la PCR en múltiples flujos de trabajo experimentales, el diseño riguroso de oligonucleótidos iniciadores (o cebadores o *primers*) constituye un paso crítico que determina la especificidad, fidelidad y eficiencia de la amplificación. La calidad del par de

cebadores impacta directamente en la sensibilidad analítica, la ausencia de artefactos como dímeros y la reproducibilidad del ensayo. En proyectos donde no existe un set de cebadores previamente caracterizado para la región genómica de interés, el diseño computacional se vuelve indispensable.

En la actualidad, la selección, validación y optimización de cebadores se realiza mediante plataformas bioinformáticas que integran parámetros termodinámicos, algoritmos de predicción estructural y análisis comparativos de secuencias. Una de las herramientas más consolidadas para esta tarea es Primer3, un *software* de uso libre desarrollado con el respaldo de instituciones científicas internacionales. Primer3 constituye un estándar global en el diseño de cebadores, ya que permite ajustar un amplio espectro de criterios fisicoquímicos como la temperatura de fusión (T_m), el contenido de GC, la propensión a estructuras secundarias, la autocomplementariedad 3', y el rango esperado de tamaño del amplicón, además de permitir delimitar regiones inclusivas o excluyentes dentro de la secuencia blanco.

El flujo de trabajo actual para el diseño de cebadores comienza habitualmente con la obtención de la secuencia objetivo en formato FASTA, descargada desde alguna base del INSDC, como GenBank o DDBJ. Una vez incorporada al interfaz de Primer3, el usuario define si desea diseñar un par de cebadores, una sonda interna (para qPCR), o ambos. La plataforma permite fijar parámetros mínimos, óptimos y máximos para la longitud del cebador, la T_m y el porcentaje de GC, lo que posibilita generar diseños compatibles con las condiciones experimentales específicas de cada laboratorio.

El *software* produce una tabla de salida detallada, donde se incluye la posición de inicio de cada cebador dentro de la secuencia, su longitud, su T_m estimada, el porcentaje de GC y la secuencia nucleotídica. Además, se presentan métricas críticas derivadas del análisis de complementariedad:

- *3' self-complementarity* o *3' stability*, que evalúa la probabilidad de que los cebadores formen dímeros anclados en la región 3', lo cual es particularmente relevante porque podría interferir en la elongación por parte de la polimerasa.
- *ANY self-complementarity*, que estima el alineamiento local máximo entre regiones internas de los cebadores, un indicador del riesgo de formación de estructuras secundarias no deseadas.

Estas puntuaciones se basan en modelos termodinámicos y matrices de penalización que evalúan complementariedad perfecta, emparejamientos ambiguos, *mismatches* y espacios

vacíos, permitiendo al investigador seleccionar las opciones más estables y confiables. Primer3 también ofrece diseños alternativos que cumplen parcialmente los criterios especificados, útiles para optimizaciones posteriores o para estrategias de ensayo múltiple.

El diseño de cebadores ya no se concibe como un proceso empírico sino como una etapa informáticamente guiada, fundamentada en principios de termodinámica, bioinformática estructural y análisis comparativo de secuencias. La integración de estos recursos digitales garantiza que la PCR, en cualquiera de sus variantes contemporáneas, pueda ejecutarse con precisión, eficiencia y reproducibilidad, características esenciales en la investigación moderna y en aplicaciones clínicas y biotecnológicas.

Introducción a NEBcutter

NEBcutter es un servidor especializado para la identificación y mapeo de sitios de restricción en secuencias de ADN, facilitando la planificación racional de estrategias de clonación, diagnóstico molecular y caracterización genómica. Al predecir cortes, fragmentos generados y mapas de restricción a partir de enzimas disponibles comercialmente, NEBcutter se convierte en un instrumento esencial para el diseño experimental en ingeniería genética y biotecnología.

BASES DE DATOS, SERVIDORES Y RECURSOS DE PROTEÍNAS

Introducción a ExPASy

Expert Protein Analysis System (ExPASy) constituye una plataforma integradora dedicada al análisis proteico y bioquímico. Desarrollado por el *Swiss Institute of Bioinformatics*, este portal no solo centraliza múltiples bases de datos curadas, como Swiss-Prot y PROSITE, sino que también ofrece herramientas analíticas para la caracterización de estructuras primarias, identificación de dominios funcionales, evaluación de modificaciones postraduccionales y modelado tridimensional. Su enfoque transversal lo convierte en una referencia central para estudios de proteómica y anotación funcional

Introducción a UniProt

Universal Protein Resource (UniProt) es el principal repositorio internacional dedicado a la anotación, caracterización y curación de proteínas. Su infraestructura combina información procedente de múltiples fuentes experimentales y computacionales, integrando datos estructurales, funcionales, taxonómicos, filogenéticos y bioquímicos. UniProt se organiza en dos grandes secciones: UniProtKB/Swiss-Prot, con anotación manual de alta calidad, y

UniProtKB/TrEMBL, con anotación automática derivada de traducciones de secuencias genómicas.

Para el análisis proteico, UniProt constituye una herramienta indispensable, ya que permite acceder a la secuencia primaria, sus dominios, modificaciones postraduccionales, patrones de expresión, interacciones moleculares y enlaces directos a bases de datos estructurales como el PDB o AlphaFold. Su uso en la formación académica favorece el desarrollo de competencias orientadas a la identificación, comparación y contextualización funcional de proteínas dentro de un marco biológico integrador.

Fundamento teórico del uso de UniProt

El uso de UniProt se sustenta en la necesidad de disponer de información proteica curada, coherente y estandarizada. El proceso de anotación manual que caracteriza a Swiss-Prot incorpora evidencia experimental proveniente de la literatura revisada por especialistas, lo que garantiza una interpretación confiable del rol biológico de cada proteína. Por su parte, TrEMBL complementa el repositorio con una amplia cobertura de secuencias derivadas de proyectos genómicos, posibilitando análisis comparativos a gran escala.

El fundamento teórico central consiste en comprender cómo la anotación proteica se articula con la función, la estructura, la evolución molecular y la regulación celular; y en aprender a interpretar dominios, motivos conservados, topología de membrana, modificaciones químicas, parámetros fisicoquímicos y evidencia experimental, consolidando una perspectiva bioquímica integral.

Protein Data Bank

El *Protein Data Bank* (PDB) constituye el archivo estructural central de la biología molecular moderna y el repositorio de referencia para el depósito, conservación y difusión de estructuras tridimensionales de macromoléculas biológicas. Desde su creación, se ha transformado en la base de datos fundamental para el análisis estructural, al almacenar modelos obtenidos mediante cristalografía de rayos X, resonancia magnética nuclear y criomicroscopía electrónica. El valor del PDB radica no solo en la magnitud de su colección, sino también en su función integradora: cada estructura depositada se vincula con información sobre secuencia, complejos biomoleculares, ligandos, condiciones experimentales, parámetros de calidad y literatura científica asociada.

La disponibilidad abierta de estos datos ha impulsado avances sustanciales en campos como el diseño racional de fármacos, la ingeniería de proteínas, la biología estructural

comparada y la predicción computacional de estructuras. En esencia, el PDB es un pilar conceptual y práctico que permite comprender la relación entre secuencia, estructura y función, y continúa siendo un recurso indispensable para interpretar los principios fisicoquímicos que gobiernan el comportamiento de las biomoléculas.

Introducción a InterPro

InterPro es una plataforma de clasificación proteica que integra diversas bases de datos de dominios, familias y motivos, tales como Pfam, PROSITE, entre otras. Esta integración proporciona una visión unificada de la arquitectura proteica y permite identificar regiones funcionales conservadas con alto nivel de confianza. Facilita la identificación de dominios catalíticos, módulos de interacción proteína–proteína, regiones transmembrana y señales de localización, constituyendo un puente entre la secuencia lineal y la función bioquímica.

Fundamento teórico del uso de InterPro

El fundamento teórico detrás de InterPro reside en el concepto de dominio proteico como unidad evolutiva y funcional. Los dominios presentan patrones conservados de secuencia y estructura que permiten inferir la función de proteínas desconocidas basándose en homología. InterPro combina algoritmos de búsqueda, modelos ocultos de Markov (HMM, del inglés *Hidden Markov Models*) y patrones de consenso para detectar familias y subfamilias, lo que permite una anotación más robusta. Su uso en trabajos prácticos enseña a interpretar arquitecturas modulares y a establecer relaciones entre función, evolución y estructura

Introducción a Pfam

Pfam es una base de datos especializada en familias de proteínas definidas por dominios conservados, construida mediante HMM. Cada familia está representada por un alineamiento múltiple y un perfil estadístico que permite identificar el dominio en nuevas secuencias con alta precisión. Pfam es particularmente valiosa en el análisis funcional, ya que permite detectar regiones catalíticas, dominios reguladores y firmas evolutivas presentes en proteínas con funciones relacionadas.

Fundamento teórico del uso de Pfam

El fundamento de Pfam radica en la detección de similitudes remotas mediante modelos estadísticos. Los HMM permiten captar patrones de conservación incluso en secuencias con baja identidad, lo que contribuye a inferir funciones evolutivamente preservadas. La comprensión del funcionamiento de Pfam permite a los estudiantes interpretar de manera precisa la arquitectura proteica e integrar el análisis estructural y funcional.

Introducción a Rasmol

La comprensión integral de la Biología Celular y Molecular contemporánea enfrenta un desafío persistente: acceder a la representación espacial de las macromoléculas que sustentan los procesos vitales. La escala nanométrica de proteínas, ácidos nucleicos y complejos supramoleculares excede nuestra intuición visual, pero su arquitectura responde a principios fisicoquímicos que permiten traducirla a modelos computacionales tridimensionales mediante algoritmos especializados y lenguajes de descripción estructural.

La modelización estructural y la visualización molecular, pilares actuales de la biología estructural computacional, requieren no solo información experimental proveniente de técnicas como cristalografía de rayos X, RMN o criomicroscopía electrónica, sino también capacidades de cómputo avanzadas capaces de procesar geometrías complejas, realizar renderizados eficientes y ejecutar simulaciones energéticas que describen dinámicas conformacionales. En este contexto, las herramientas digitales permiten integrar datos provenientes de repositorios como el PDB o AlphaFold, entre otros, ampliando el espectro de análisis hacia escenarios antes inalcanzables.

Hace apenas unas décadas, la posibilidad de diseñar *in silico* un receptor de membrana, explorar sus cavidades funcionales o ensayar virtualmente la unión de ligandos mediante herramientas automatizadas habría sido inconcebible. Más sorprendente aún es que estos recursos hoy estén disponibles en interfaces abiertas y accesibles desde una computadora personal, democratizando la exploración estructural a estudiantes e investigadores de todos los niveles.

Las interacciones entre ADN, ARN y proteínas, fundamentales para la regulación génica, la replicación y la reparación, pueden examinarse a resolución atómica utilizando *software* gratuito que combina motores de renderizado con bibliotecas de datos tridimensionales. Esta posibilidad abre la puerta a un aprendizaje más intuitivo, donde observar la geometría molecular permite internalizar principios funcionales difíciles de comprender solo desde descripciones textuales.

Para los estudiantes que se inician en este campo, aplicaciones clásicas como RasMol continúan siendo herramientas valiosas. Este programa, desarrollado originalmente por Roger Sayle en 1992, ofrece una plataforma liviana pero robusta para la exploración visual de macromoléculas, y representa una puerta de entrada a sistemas más complejos como PyMOL, UCSF ChimeraX o JSmol.

Introducción a GOR

En complemento, GOR representa uno de los métodos clásicos, pero aún relevantes, para la predicción computacional de estructura secundaria proteica. Basado en principios de teoría de la información y en la propensión estadística de cada residuo a formar hélices α , láminas β o regiones desordenadas, GOR permite inferir rasgos estructurales a partir de secuencias primarias, aportando un primer nivel de aproximación estructural previo a análisis tridimensionales más complejos.

Introducción a AlphaFold

AlphaFold es un sistema de inteligencia artificial diseñado para la predicción de estructuras tridimensionales de proteínas a partir de su secuencia primaria. Basado en redes neuronales profundas entrenadas con información estructural del PDB, AlphaFold ha transformado el campo de la biología estructural al lograr niveles de precisión comparables a técnicas experimentales como cristalografía o RMN en muchos casos.

Su interfaz AlphaFold Protein Structure Database permite visualizar modelos tridimensionales, evaluar regiones de alta o baja confianza y explorar la relación entre estructura y función.

Fundamento teórico del uso de AlphaFold

El fundamento teórico de AlphaFold se basa en principios fisicoquímicos y evolutivos traducidos a modelos de aprendizaje automático. El sistema utiliza información sobre coevolución de residuos, distancias interatómicas y geometrías plausibles para predecir la conformación espacial más estable para una secuencia dada. El uso de AlphaFold permite comprender cómo la estructura tridimensional condiciona la función biológica, cómo se organizan los dominios, y cómo ciertos residuos críticos participan en la estabilidad o actividad catalítica.

TALLER n.º 5: APLICACIÓN DE MARCADORES MOLECULARES

OBJETIVOS

- Comprender los fundamentos conceptuales y metodológicos de los principales marcadores moleculares utilizados en biología moderna.
- Analizar sus aplicaciones en genética, biología evolutiva, biotecnología y estudios de biodiversidad.
- Interpretar perfiles genéticos obtenidos mediante diferentes plataformas experimentales.
- Integrar estos marcadores en propuestas didácticas para la enseñanza universitaria de la genética molecular y la biotecnología.

Plan de actividades

Actividad 1

¿Qué son los marcadores moleculares? Describa en qué consisten los marcadores moleculares microsatélites, RFLP y RPLP-PCR, RAPD. Esquematice cómo se hace cada una de ellas.

Actividad 2

La anemia de células falciformes es una enfermedad sanguínea caracterizada por la presencia de glóbulos rojos con forma anormal (de hoz). La forma de hoz está asociada a una pérdida de flexibilidad celular y resulta en movimientos restringidos de los glóbulos rojos a través de los capilares más pequeños, provocando disminuciones en la disponibilidad de oxígeno de los tejidos por ellos irrigados. La enfermedad es crónica: los individuos se encuentran en buen estado la mayor parte del tiempo, pero sufren periódicamente de dolorosos ataques y su esperanza de vida está disminuida. La anemia falciforme es producto de un problema genético. Las personas con la enfermedad nacen con dos genes de células falciformes, uno de cada padre. La presencia del gen de células falciformes y otro normal se denomina rasgo drepanocítico. Aproximadamente una de cada 12 personas de raza negra es portadora del rasgo drepanocítico. La causa es una sustitución puntual (A por T) en el gen de la β globina que provoca un cambio de sentido en la cadena polipeptídica en donde el ácido glutámico es reemplazado por valina. La β globina resultante (globina mutante) se denomina hemoglobina S. La hemoglobina S es soluble cuando está completamente oxigenada, pero cuando las tensiones de oxígeno disminuyen, sufre un marcado cambio conformacional que conduce a la deformación del glóbulo rojo y a la hemólisis. El diagnóstico molecular para la mutación

descripta consiste en amplificar mediante PCR una región de ADN de 233 pb que abarca el sitio de la mutación y luego tratar al producto amplificado con la enzima de restricción *Dde I*. Esta enzima produce dos fragmentos de 178 y 55 pb, respectivamente. La discriminación de esta prueba se debe a que la mutación produce la pérdida del sitio de restricción para esta enzima. De esta manera, la resolución electroforética puede revelar la presencia o ausencia de la mutación.

Resuelva: Una pareja tiene dos hijos: una niña de diez años sana y un niño de cuatro años con anemia de células falciformes. La mujer está esperando un nuevo hijo y se ha realizado un muestreo de vellosidades coriónicas para determinar si su nuevo hijo (el probando), heredará la enfermedad. Se muestra el resultado de la prueba de diagnóstico tal como se describió previamente (**Figura 7.9**).

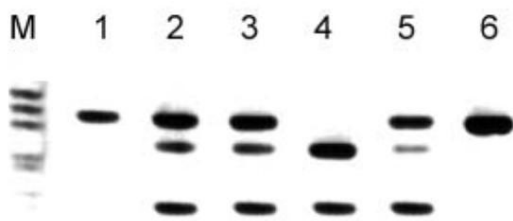


Figura 7.9. Gel de agarosa correspondiente a los productos obtenidos tras la amplificación de un fragmento de 233 pb que abarca el sitio de mutación, seguido de digestión con la endonucleasa de restricción *DdeI*. M: marcador de peso molecular; 1: control; 2: padre; 3: madre; 4: probando; 5: hija (10 años); 6: hijo (4 años).

Teniendo en cuenta el resultado de la prueba molecular determine el genotipo de cada uno de los integrantes de la familia. Justifique explicando cómo interpreta el patrón de bandas en cada caso.

Actividad 3

La fotografía de una electroforesis en gel de agarosa al 2 % se obtuvo al utilizar RAPD para analizar distintas variedades de tomate (**Figura 7.10**). ¿Podría identificar cuantas variedades diferentes hay?

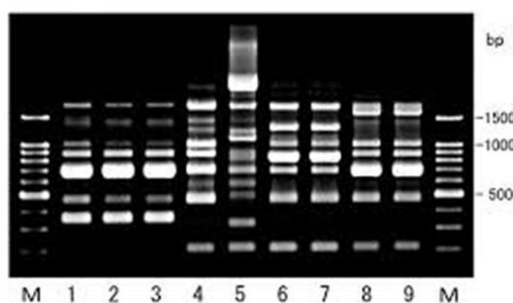


Figura 7.10. Gel de agarosa al 2 % correspondiente a los productos de RAPD obtenidos para evaluar la variabilidad genética entre distintas variedades de tomate. M: marcador de peso molecular; 1-9: muestras.

Actividad 4

La fotografía de una electroforesis en gel de poliacrilamida al 12 % teñido con nitrato de plata se obtuvo al utilizar microsatélites para una población (**Figura 7.11**). ¿Podría decir cuántos alelos hay y cuáles individuos son homo y heterocigotos?

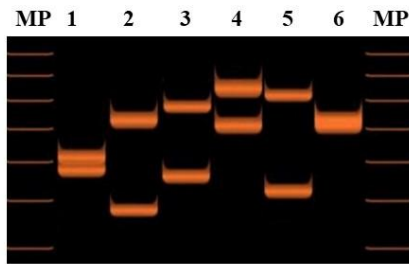


Figura 7.11. Gel de poliacrilamida 12 % teñido con nitrato de plata correspondiente al perfil de bandas obtenido mediante electroforesis de productos amplificados de microsatélites en una población analizada. M: marcador de peso molecular; 1-6: muestras individuales.

Actividad 5

Utilizando la siguiente secuencia nucleotídica del gen del receptor 2 de somatostatina, involucrado en cáncer, realice las siguientes consignas:

GTCAACTTCTTAGGGGTCAAAGTATGTGCTTTTTGAAGCCACAGCCCTCCCCGACATGTGCGTCAGCAGATGATGGCTGAACCCAAACCCTTCCCTACTATTGGAAAAACAACTCAAAAAGTCTGCACACTGATGAGGAACTCTAGAGCTTAATGTTGATGTGGA AAGATAATACATTTTTCAATTTAAGAGTATGTCTGAGAGGCTAAACCAGAAATGTGT AAATTTGGTGAGACTTTAAACAGCCTGTGACCGACGGGCCAATCTTCCTCTTTTCCTTCCAGATGTCACACTG****

a- Escriba los cebadores, sentido y antisentido subrayados en la secuencia en sentido 5'-3'. ¿Qué programa podría utilizarse para corroborar que los cebadores hibriden con la secuencia? Nombre tres características que se tengan en cuenta para el diseño de los mismos.

b- Esta secuencia podría ser digerida con la Enzima de Restricción tipo II: Bpu1102I: G-CTNAGC (la secuencia diana probable de la enzima, se encuentra resaltada con negrita en la secuencia). ¿Podría actuar la enzima en la secuencia resaltada? ¿Por qué? Se encuentra marcada en negrita la secuencia diana en el fragmento a amplificar, indique cuál es el nucleótido polimórfico. ¿Cuál es el nucleótido variable en la diana de la enzima? En caso de que consideres que la enzima reconocerá el sitio de restricción, ¿qué tamaño tendrán los fragmentos obtenidos?

c- Las muestras de varios pacientes fueron digeridas con la enzima *Bpu1102I*. Los resultados de la digestión fueron verificados mediante electroforesis en gel de agarosa. Esquematice el gel de agarosa incluyendo un marcador de peso molecular que represente una escalera de 100 pb, un fragmento amplificado sin digerir, y los fragmentos digeridos de un individuo homocigota para el alelo A, otro para el alelo G y uno heterocigota A/G.

Actividad 6

Nosotros deseamos estudiar la frecuencia del polimorfismo T80C del gen SSTR2 en una población de pacientes diagnosticados con cáncer de mama. A continuación, se muestra la secuencia (5'→3') que queremos amplificar del exón 2 de dicho gen:

GCTGGCTGGAAGTCAACCATGGCTATCCATTCCATTTGACCTCAATGGCTCTGTGG
 ACTCAATGGAAGTCAACCATGGCTATCCATTCCATTTGACCTCAATGGCTCTGTGG
 TGTCAACCAACACCTCAAACCAGACAGAGCCGTACTATGACCTGACAAGCAATGC
 AGTCCTCACATTCATCTATTTTGTGGTCTGCATCATTGGGTTGTG

Te brindamos los siguientes datos en la **Tabla 7.5**.

Tabla 7.5.

| Gen- Polimorfismo | Cebador sense (5'→3') | Cebador antisense (5'→3') | T° hibridación |
|----------------------|--|---------------------------|-------------------|
| SSTR2-T80C | GCTGGCTGGAAGTCAACCATGGCTATCCATTCCATTTGACCTCAATGGCTCTGTGG | CACAACCCAATGATGCAGAC | 55 |

Marca los cebadores en la secuencia y responde las siguientes preguntas:

a- ¿Con qué programa puede corroborar la hibridación de los cebadores? Teniendo en cuenta la temperatura de hibridación informada, ¿qué ciclado propondría? ¿De qué tamaño, en pb, es el fragmento a amplificar?

b- En el fragmento a amplificar se encuentran marcadas las secuencias de restricción de la enzima *HincII*: GTC-AAC. Y el nucleótido polimórfico está subrayado en dicha secuencia, sabiendo que el polimorfismo es T80C.

¿Cuántos fragmentos observaré en la electroforesis si el producto amplificado fue cortado por la enzima de restricción? ¿De qué tamaños serán dichos fragmentos digeridos?

Esquematice en un gel de agarosa cómo se observaría una muestra homocigota T/T, heterocigota y homocigota C/C. No olvide colocar un peso molecular de referencia.

Actividad 7

a- Utilizando la siguiente secuencia nucleotídica donde se indica dónde hibridan los cebadores: Secuencia del exón 5 del gen PTPN6, fosfatasa involucrada en cáncer y enfermedades inmunológicas, en la secuencia se encuentran en negrita y subrayados los cebadores, y solo subrayados, los pares de bases polimórficos:

5' **GTACCATGGCCACATGCTCTGGCGGGCAGGCAGAGACGCTGCTGCAGGCCAAG**
 GGCGAGCCCTGGACGTTTCTTGTGCGTGAGAGCCTCAGCCAGCCTGGAGACTACG
 AGCTTTCTGTGCTCAGTGACCAGCCCAAGGCTGGCCCAGGCTCCCCGCTCAGGGT
 CACCCACATCA**AGGTCATGTGCGAGGTAAG**GTTTCCTGCAGGA-3'

Coloque cuáles serían los cebadores en las siguientes líneas:

Primer izquierda: 5`- _____ -3`

Primer derecha. 5`- _____ - 3`

b- Considerando la secuencia del punto anterior, los cebadores amplifican una región de _____ pb. El sitio de corte de la enzima *AluI* es: AG[^]CT y en esta secuencia reconoce el polimorfismo A670T.

c- ¿Podría actuar la enzima en alguno de los pares de bases polimórficos? ¿Por qué?

d- ¿Cuál es el sitio polimórfico en la secuencia que reconoce la enzima?

e- Complete la información de la **Tabla 7.6** y esquematice un gel de agarosa con los fragmentos obtenidos luego de una digestión enzimática.

Tabla 7.6.

| Genotipo | | | |
|----------|-------------|----------|----------|
| Bandas | 109 y 84 pb | _____ pb | _____ pb |

Actividad 8

Si usted trabaja en un laboratorio de biología molecular y tiene que poner a punto técnicas para detectar SNP. Comente:

- ¿Qué reactivos necesitaría?

- ¿En qué tipos de geles resolvería los fragmentos amplificados?

Nota: si lo desea para este punto, puede elegir un SNP en particular para tomarlo como ejemplo y desarrollar el experimento.

Actividad 9

Si usted está investigando un gen, como p. ej., el *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator* (CFTR), en el cual se conocen muchos polimorfismos, pero además se sabe que pueden aparecer mutaciones nuevas:

- ¿Qué técnica escogería, de las que se mostraron en teoría, para detectar un polimorfismo ya descrito? ¿Con qué polimorfismo comenzaría el estudio confirmatorio de la enfermedad? ¿Por qué?

- ¿Cómo haría para detectar si un fragmento amplificado contiene SNP desconocidos?

- ¿En qué región de CFTR, teniendo en cuenta la estructura de un gen, nos interesaría encontrar polimorfismos si se trata de un transportador de iones?

Actividad 10

El gen TYMS (timidilato sintasa) presenta un polimorfismo de repeticiones en tándem de 28 pb el cual se encuentra en la región 5'UTR (TSER). En el laboratorio logramos amplificar estas regiones, obteniéndose según el número de repeticiones los fragmentos del esquema en la **Figura 7.12**.

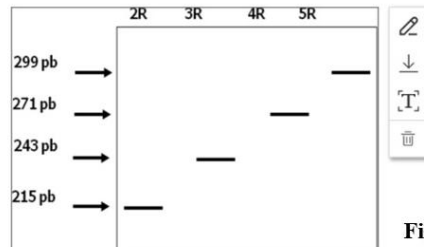


Figura 7.12.

Realizando un gel de agarosa para 5 muestras, se obtuvieron los resultados que se observan en el esquema de la **Figura 7.13**.

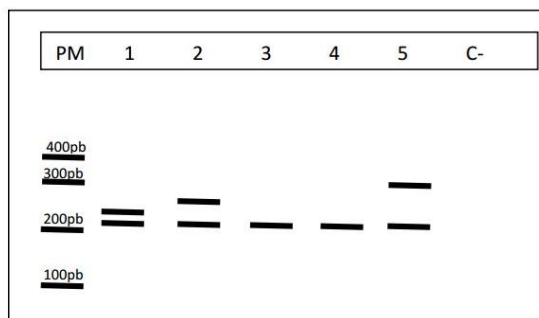


Figura 7.13. Primer carril: peso molecular (PM), indicando las bandas de 100, 200, 300 y 400 pb. De los carriles 2 al 6, se encuentran numeradas las muestras del 1 al 5. En el carril 7 se encuentra el control negativo de la reacción.

Observando el esquema interprete el número de repeticiones de TSER para las 5 muestras. Indique en cada caso si el individuo es homocigota o heterocigota.

Actividad 11

Se amplificó el siguiente fragmento del exón 2 del gen SSTR2 (**Figura 7.14**). En rojo se indica la secuencia amplificada, en verde la secuencia que contiene el SNP C749T y en lila el SNP G846A, en amarillo se muestra en ambas secuencias el nucleótido polimórfico.

```

CCCCTCACCATCATCTGTCTTTGCTACCTGTTTCATTATCATCAAGGTGAAGT
CCTCTGGAATCCGAGTGGGCTCCTCTAAGAGGAAGAAGCTCTGAGAAGAAAGG
TCACCCGAATGGTGTCCATCGTGGTGGCTGTCTTCACTCTTCTGCTGGCTTCC
CTTCTACATATTCAACGTTTCTTCCTTTCCATGCCATCAGCCCCACCCCA
GCCCTAAAGGCATGTTTGACTTTGTGGTGGTCCCTCACCT
    
```

Figura 7.14. Secuencia de un fragmento del exón 2 del gen SSTR2.

Luego de amplificar, se mandó al servicio de secuenciación de MACROGEN (Corea) y se obtuvo el cromatograma de la **Figura 7.15**.

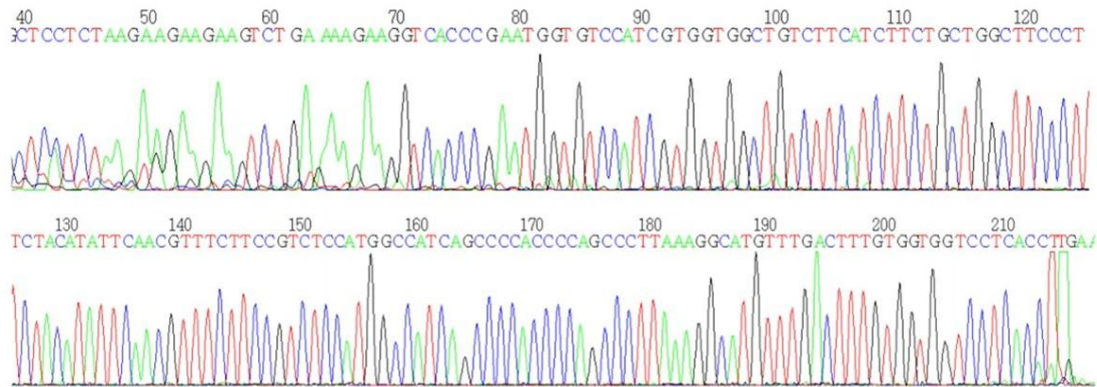


Figura 7.15. Electroferograma de un fragmento amplificado del exón 2 del gen SSTR2.

Indique dónde se encuentran los polimorfismos analizados y qué alelo/s presenta el individuo en estas posiciones.

Actividad 12

En los electroferogramas de la **Figura 7.16** observamos dos individuos (A y B) con variantes alélicas indicadas por flechas. Indica en ambos casos qué alelos presentan cada uno de los individuos y especifica si la variante se encuentra en homocigosis o heterocigosis.

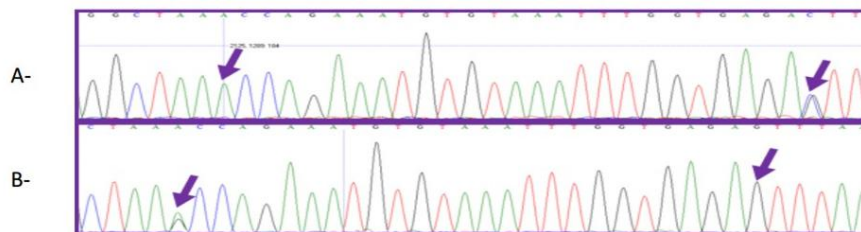


Figura 7.16. Electroferogramas de dos individuos (A y B) con variantes alélicas indicadas por flechas.

Actividad propuesta para la práctica docente.

Esta actividad propone que los docentes introduzcan a sus estudiantes en el concepto de variabilidad genética mediante una simulación sencilla del uso de marcadores moleculares. Para ello, cada grupo de estudiantes recibirá tiras de papel que representen “fragmentos de ADN” con patrones distintos de secuencias repetitivas que emulan microsatélites. Los estudiantes deberán ordenar las tiras, comparar sus longitudes y registrar las diferencias entre individuos simulados. Luego, se los guiará para construir un “gel de agarosa” en papel, ubicando los fragmentos según su longitud relativa y generando un perfil molecular similar a un patrón real de marcadores. A partir de esos resultados, los alumnos interpretarán similitudes y diferencias, discutirán qué tipo de marcador están representando y reflexionarán sobre aplicaciones en

identificación, genética poblacional o análisis de parentesco. La actividad concluye con una puesta en común en la que los docentes orientan la comprensión del carácter polimórfico de estos marcadores y cómo su análisis experimental permite revelar la diversidad genética subyacente en organismos de interés biológico.

BIBLIOGRAFÍA

- Claros Díaz, M. G. 2001. “Bioquímica aplicada: Manual para el diseño experimental y el análisis de datos en bioquímica y biología molecular” Asturias, España. Editorial Septem ediciones. Pag 51/56.
- Cariaga Martinez, A. E., Zapata P. D. 2005 “El laboratorio de biología molecular, una guía práctica”. Editorial Universitaria de Misiones.
- Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser C, Krieger M, Scott M, Zipursky S, Darnell J. Biología celular y molecular (quinta edición). Buenos Aires, Editorial Panamericana. 2005.

TALLER n.º 6: BIOINFORMÁTICA

La bioinformática constituye un campo interdisciplinario que integra principios de la biología molecular, la informática, la estadística y las ciencias de datos con el propósito de analizar, interpretar y gestionar la información biológica a gran escala. En este taller se enfatizará en herramientas de análisis de secuencias biológicas, en particular de datos genómicos y proteómicos obtenidos por tecnologías de secuenciación de nueva generación que han convertido la bioinformática en un componente esencial de la investigación científica contemporánea y el desarrollo biotecnológico y biomédico.

Las plataformas bioinformáticas disponibles en línea desempeñan un papel central en este proceso, ya que permiten trabajar con bases de datos ampliamente curadas y herramientas analíticas de última generación sin necesidad de infraestructura computacional local. Recursos como el NCBI, UniProt, Ensembl, InterPro, Pfam y AlphaFold, entre muchos otros, facilitan la recuperación, anotación funcional, alineamiento y análisis estructural de secuencias biológicas. Estas herramientas no sólo brindan acceso a repositorios de referencia, sino que además permiten inferir patrones evolutivos, predecir dominios proteicos, identificar regiones conservadas y explorar posibles relaciones estructura-función que resultan críticas para el diseño de experimentos y la interpretación de resultados experimentales.

El abordaje de datos reales promueve el pensamiento crítico, la resolución de problemas y la autonomía en el manejo de información biológica compleja. A su vez, introduce a los estudiantes en los flujos de trabajo utilizados en investigación profesional, fortaleciendo su comprensión de los procesos mediante los cuales se generan y validan hipótesis en biología molecular y bioquímica.

En este taller, los estudiantes adquirirán las bases conceptuales y operativas para identificar las herramientas bioinformáticas más relevantes y aplicarlas en el análisis de secuencias de ADN y proteínas. La familiarización con estos recursos permitirá interpretar datos biológicos con mayor profundidad e integrar enfoques computacionales en el estudio de fenómenos moleculares, ampliando así su capacidad para abordar problemas científicos desde una perspectiva integral y actualizada.

OBJETIVOS

Los objetivos del taller n.º 6 son:

- Reconocer las herramientas bioinformáticas disponibles *on-line*.

- Utilizar herramientas bioinformáticas para el análisis de secuencias de ADN y proteínas.

Plan de actividades

Actividad n.º 1: secuencia de ADN

1. PCR. A partir de la siguiente secuencia:

```
TGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGGAGCGATTTCATCATCACGCAGCTTTTCTTTGAGGCT  
GACACATTCTTCCGCTTTGTGAAGGCATGCACCGACATGGGCATCACTTGCCCCATCGT  
CCCCGGGATCTTTCCCATCCAGGTGAGGGGCCAGGAGAGCCCATAAGCTCCCTCCAC  
CCCACTCTCACCGCACCGTCCT
```

- Deducir los cebadores resaltados con el color verde:
F
R
- Diseñar un nuevo par de *primers* con el programa Primer3.
- En ambos casos, ¿qué tamaño tendrá el amplicón obtenido?

2. Endonucleasas de restricción (ER)

- Copien la secuencia amplificada por los *primers* F y R, péguenla en el programa NEB CUTTER (www.tools.neb.com). Elijan una enzima de restricción (ER) que detecte el par de bases **subrayado y resaltado** con color fucsia, considerando que **es un polimorfismo que cambia una C por una T**.
- Efectúen la digestión con las ER seleccionadas.
- ¿Cuántos sitios de reconocimiento observa para la ER en el fragmento amplificado?
- ¿En qué posición (en número de pares de bases) se encuentran los diferentes sitios diana de las ER?
- Simulen una corrida electroforética electrónica que les permita discriminar los fragmentos obtenidos luego de la digestión con la enzima elegida.

3. Base de datos del NCBI.

- Utilizando la secuencia en el punto 1, colocar en el programa de búsqueda BLASTn <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, determinar con qué gen presenta identidad y a qué organismo pertenecería dicha secuencia. Para ello responder: ¿Cuál fue la secuencia más similar informada en el alineamiento? ¿Qué porcentaje de identidad tiene la

secuencia analizada con la secuencia más similar? ¿A qué especies y a qué gen pertenecen las 3 más parecidas?

- Ingresar al PubMed (www.pubmed.com) en la solapa de *Gene* y colocar el nombre del gen determinado. ¿Este gen presenta variantes en ClinVar?
- Ingrese al código de OMIM, ¿qué información del GEN obtiene de esta base de datos?

Actividad n.º 2: secuencia de proteínas

Utilizando la siguiente secuencia, responda las preguntas:

> Secuencia 1

```
MDMADEPLNGSHTWLSIPFDLNGSVVSTNTSNQTEPPYDLTNSAVLTFIYFVVCIIIGLCGNTLVIYVILRYAKMKTITNIYILNLAIADEL  
FMLGLPFLAMQVALVHWPFKAICRVVMTVDGINQFTSIFCLTVMSIDRYLAVVHPIKSAKWRRPRTAKMITMAVWGVSLLVILPIMI  
YAGLRNQQWGRSSCTINWPGESGAWYTGFIYFILGFLVPLTIICLYLFIIIKVKSSGIRVGSKRKKSEKKVTRMVSIVVAVFIFCWL  
PFYIFNVSSVSMASPTPALKGMFDFVVLTYANSCANPILYAFLSDNFKKSQNVLCVVKVSGTDDGERSDSKQDKSRLNETTETQ  
RTLLNGDLQTSI
```

- Utilizando la herramienta BLASTp contrastando con la base de datos de proteínas UniProt, obtenga el código de la secuencia y detalle las características proteicas. Indique si pertenece a una RefSeq (en ese caso diga el código y su nombre). Mencione en qué organismo fue obtenida, a qué familia pertenece y qué dominios tiene (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Además, mencione con qué otro organismo obtuvo la segunda mejor similitud (diga el porcentaje) y cuál fue el valor E obtenido.
- Obtenga el archivo fasta (.txt) y nómbrelo con el mismo nombre de la proteína.
- Obtenga el código de acceso del *Protein Data Bank* perteneciente a la proteína con mayor identidad a su secuencia *query*, ingresando al enlace de ModBase: Database of Comparative Protein Structure Models (<https://modbase.compbio.ucsf.edu/>). Luego, descargue el archivo .gz para visualizar la imagen tridimensional en el programa RasMol (<http://rasmol.org/>) y obtenga una imagen de la proteína, ¿con qué nivel estructural está trabajando?
- Ingrese al programa GOR (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_gor4.html). ¿Qué información obtuvo de esta proteína?
- Búsqueda y descarga de la secuencia en formato FASTA (UniProt o NCBI-Protein). Registrar los datos de la proteína: ID, longitud, organismo, funciones.

- f. Una vez obtenida la secuencia FASTA de la proteína seleccionada, acceder a AlphaFold Protein Structure Database (<https://alphafold.com/>) y cargar la secuencia en FASTA. Descargar el archivo .pdb y archivos auxiliares (PAE, ranking confidence, etc.).
- g. Interpretar las métricas de calidad estructural mediante pLDDT (*confidence score*), *Predicted Aligned Error* (PAE), predicción de dominios y regiones desordenadas: identificar regiones de alta confianza (>90), regiones flexibles/desordenadas (<50), reconocer incertidumbre en la orientación relativa de dominios y evaluar la precisión del ensamblaje global.
- h. Complementar el análisis integrando con bases de datos funcionales: Pfam, para ver dominios conservados; InterPro, para ver anotación funcional integrada; PROSITE, para ver motivos. Comparar con estructuras cristalográficas depositadas en PDB (si existen)

Actividad propuesta para la práctica docente.

Se propone a los futuros docentes de Biología una actividad para llevar a cabo con estudiantes del nivel secundario. Esta actividad titulada “*Del código al carácter: identificando un gen y su proteína*” tiene como propósito acercarlos al análisis de secuencias biológicas mediante herramientas digitales y procedimientos básicos propios de la bioinformática. El eje central es favorecer la comprensión del flujo de información genética: desde el ADN hasta la proteína, y promover una mirada crítica sobre la relevancia de las bases de datos biológicas en la investigación contemporánea.

La propuesta inicia con una breve introducción guiada por el docente, en la cual se explican los conceptos fundamentales: qué es una secuencia de ADN en formato digital, cómo se estructuran las bases de datos biológicas y cuál es la lógica del código genético que permite traducir nucleótidos en aminoácidos. Esta instancia introductoria, de carácter demostrativo, busca familiarizar a los estudiantes con la representación simbólica de la información genética y su relación con la biología molecular real.

Posteriormente se desarrolla la actividad práctica, en la que cada grupo de estudiantes recibe una secuencia ficticia de ADN de entre 150 y 300 pares de bases. A partir de ella, deben identificar el codón de inicio, marcar el marco de lectura y detectar posibles codones de terminación. Empleando una tabla impresa del código genético, los estudiantes traducen manualmente la secuencia y obtienen la cadena de aminoácidos correspondiente. Esta traducción puede complementarse con algún traductor educativo digital para verificar la validez

del proceso. Una vez obtenida la secuencia proteica, se invita a los grupos a realizar inferencias preliminares sobre posibles funciones, analizando características simples como regiones ricas en un determinado residuo, repeticiones o motivos reconocibles. Para facilitar este análisis, se entrega una lista orientativa que distingue proteínas enzimáticas, estructurales, reguladoras o asociadas a señales celulares.

Como variantes, la actividad puede ampliarse incorporando la visualización de proteínas reales mediante el PDB, el uso de secuencias asociadas a organismos locales o el cruce con contenidos de Matemática e Informática para enriquecer el análisis de patrones y la lógica computacional.

BIBLIOGRAFÍA

- AlphaFold Protein Structure Database. (s.f.). European Bioinformatics Institute.
<https://alphafold.ebi.ac.uk>
- BLAST. (s.f.). National Center for Biotechnology Information.
<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- Cariaga Martínez, A. & Zapata, P. D. (2007). El laboratorio de Biología Molecular. Edición ampliada. Editorial Universitaria de Misiones.
- DDBJ (DNA Data Bank of Japan). (s.f.). National Institute of Genetics.
<https://www.ddbj.nig.ac.jp>
- Ensembl. (s.f.). European Bioinformatics Institute & Wellcome Trust Sanger Institute.
<https://www.ensembl.org>
- ExpASY (Expert Protein Analysis System). (s.f.). Swiss Institute of Bioinformatics.
<https://www.expasy.org>
- GenBank. (s.f.). National Center for Biotechnology Information.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>
- GOR: Secondary Structure Prediction. (s.f.). Iowa State University.
<https://gor.bb.iastate.edu/>
- InterPro. (s.f.). European Bioinformatics Institute. <https://www.ebi.ac.uk/interpro/>
- NCBI (National Center for Biotechnology Information). (s.f.). National Library of Medicine. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>
- NEBcutter. (s.f.). New England Biolabs. <https://nc2.neb.com/NEBcutter2/>
- PDB (Protein Data Bank). (s.f.). RCSB Protein Data Bank. <https://www.rcsb.org>

- Pfam. (s.f.). European Bioinformatics Institute. <https://www.ebi.ac.uk/interpro/pfam/>
- Primer3. (s.f.). Whitehead Institute for Biomedical Research. <http://primer3.ut.ee/>
- RasMol. (s.f.). RasMol Open Source Project. <http://www.rasmol.org>
- UniProt. (s.f.). UniProt Consortium. <https://www.uniprot.org>

ANEXOS

ANEXO 1.1. FICHAS DE SEGURIDAD DE LOS REACTIVOS QUÍMICOS USADOS EN LOS TRABAJOS PRÁCTICOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR.

Cloroformo (CHCl₃)

Peligros: tóxico, sospecha de carcinogenicidad, nocivo por inhalación y contacto.

Riesgos: puede causar somnolencia, mareos, daño hepático, renal y del SNC. Irritante de piel, ojos y vías respiratorias.

Precauciones: usar bajo campana extractora, con guantes resistentes y gafas.

Almacenamiento: en recipientes herméticos, en lugar fresco, protegido de la luz.

En caso de derrames: absorber con material inerte y desechar como residuo halogenado.

Alcohol isoamílico (C₅H₁₂O)

Peligros: líquido inflamable, irritante para piel, ojos y mucosas.

Riesgos: vapores pueden causar mareos, cefalea y náuseas.

Precauciones: manipular en área ventilada, evitar inhalación.

Almacenamiento: en envases herméticos, lejos de fuentes de calor.

En caso de derrames: absorber con material absorbente no combustible.

Etanol absoluto (C₂H₆O)

Peligros: altamente inflamable, vapores irritantes.

Riesgos: irritante ocular, puede causar somnolencia y vértigo.

Precauciones: evitar llamas y chispas, usar protección ocular, cerra bien el envase.

Almacenamiento: envase hermético, temperatura ambiente controlada.

En caso de derrames: lavar con agua abundante después de absorber.

Isopropanol (C₃H₈O)

Peligros: líquido y vapor inflamable.

Riesgos: irritación ocular y respiratoria. Efectos narcóticos por inhalación.

Precauciones: usar en campana, evitar contacto prolongado.

Almacenamiento: envase cerrado, lejos de calor o ignición.

En caso derrames: absorber con material inerte.

Acetato de potasio (C₂H₃KO₂)

Peligros: baja toxicidad. Puede irritar ojos y piel.

Riesgos: la inhalación de polvo causa irritación respiratoria.

Precauciones: usar guantes y gafas de seguridad.

Almacenamiento: en recipientes bien cerrados, en lugar seco.

En caso de derrames: recoger en seco y limpiar con agua.

Tris

Peligros: baja toxicidad, irritante ocular y dérmico.

Riesgos: la inhalación de polvo puede causar irritación.

Precauciones: usar gafas y guantes al preparar soluciones.

Almacenamiento: envase cerrado, ambiente seco y fresco.

En caso de derrames: limpiar con agua.

EDTA

Peligros: irritante ocular y dérmico.

Riesgos: el polvo puede causar irritación respiratoria.

Precauciones: evitar inhalación, usar guantes y gafas.

Almacenamiento: lugar fresco, envase hermético.

En caso de derrames: recoger en seco, ventilar el área.

β -Mercaptoetanol (HS-CH₂-CH₂-OH)

Peligros: muy tóxico, corrosivo, altamente volátil, olor penetrante.

Riesgos: daño grave por inhalación o ingestión. Irritante ocular y dérmico.

Precauciones: manipular solo en campana extractora, con doble guante y gafas.

Almacenamiento: recipientes herméticos, a baja temperatura.

En caso de derrames: neutralizar con absorbente especial, desechar como residuo tóxico.

SDS

Peligros: irritante cutáneo, ocular y respiratorio.

Riesgos: puede causar dermatitis por exposición repetida.

Precauciones: usar guantes, gafas y mascarilla en polvo seco.

Almacenamiento: envase cerrado, lugar seco y ventilado.

En caso de derrames: recoger en seco y ventilar.

Fenol (C₆H₅OH)

Peligros: altamente corrosivo y tóxico.

Riesgos: causa quemaduras graves, absorción cutánea potencialmente letal.

Precauciones: manipular en campana, usar guantes resistentes a químicos y protección facial.

Almacenamiento: recipiente opaco, lugar fresco, protegido de la luz.

En caso de derrames: neutralizar con solución de polietilenglicol o glicerol, recoger con absorbente.

Agarosa

Peligros: no se considera peligrosa. El polvo puede generar irritación respiratoria.

Riesgos: irritación leve en mucosas y ojos.

Precauciones: evitar la inhalación del polvo, usar mascarilla al pesar.

Almacenamiento: a temperatura ambiente, seco, en envase hermético.

Derrames: barrer en seco, evitar dispersión del polvo.

Azul de bromofenol

Peligros: considerado de baja toxicidad, pero puede causar irritación en piel, ojos y vías respiratorias.

Riesgos: mancha permanentemente la piel y la ropa.

Precauciones: usar guantes y gafas.

Almacenamiento: a temperatura ambiente, protegido de la luz.

Derrames: absorber con material absorbente, lavar con agua y jabón.

Reactivos de PCR

Peligros: considerados de baja toxicidad, aunque algunos aditivos pueden ser irritantes.

Riesgos: irritación dérmica y ocular en contacto directo.

Precauciones: manipular con guantes y gafas, evitar contaminación cruzada.

Almacenamiento: a -20 °C, evitar ciclos repetidos de congelamiento/descongelamiento.

Derrames: limpiar con toallas absorbentes y agua, desechar como residuo biotecnológico.

GelRed

Peligros: menos tóxico que el bromuro de etidio, pero potencialmente mutagénico.

Riesgos: puede causar irritación dérmica y ocular, riesgo de toxicidad genética.

Precauciones: manipular con guantes de nitrilo, gafas y bata. No pipetear con la boca.

Almacenamiento: en oscuridad, refrigerado (4 °C) o congelado según fabricante.

Derrames: Absorber con material inerte, desechar como residuo especial para colorantes mutágenos.

Reactivo de Bradford

Peligros: inflamable (por etanol), corrosivo (ácido fosfórico), puede manchar permanentemente.

Riesgos: irritación de piel, ojos y vías respiratorias.

Precauciones: manipular con guantes, gafas y en lugar ventilado.

Almacenamiento: envase hermético, protegido de la luz.

Derrames: absorber con material inerte, lavar con abundante agua.

Poliacrilamida

Peligros: la acrilamida monómera es neurotóxica, probable carcinógeno. El gel polimerizado ya no es tóxico.

Riesgos: irritación dérmica y ocular, toxicidad neurológica por exposición prolongada a monómero.

Precauciones: preparar en campana, guantes dobles, gafas. Nunca tocar geles sin guantes (pueden contener monómero residual).

Almacenamiento: monómero a 4 °C protegido de la luz. Geles ya preparados a 4 °C.

Derrames: absorber con material inerte, desechar como residuo tóxico.

ANEXO 1.2. PROTOCOLOS DE EXTRACCIÓN DE ARN A PARTIR DE SANGRE.

Protocolo convencional de extracción de ARN total a partir de sangre entera

(Chomczynski y Sacchi, 1987)

Muestra: sangre entera anticoagulada con EDTA y heparina para inhibir las enzimas retrotranscriptasas, importantes en los usos posteriores del ARN aislado.

Equipamientos

- Microcentrífuga refrigerada
- Micropipetas automáticas
- Agitador vórtex
- Baño de hielo
- Gradillas

Materiales

- Agujas y jeringas descartables
- Ligas, alcohol y torundas de algodón
- Frascos pequeños (tipo antibiótico) tratados con agua DEPC y autoclavados, conteniendo 20 μ l EDTA por cada 2 a 2,5 mL de sangre obtenida.
- Puntas (*tips*) amarillas y azules libres de ARNAsas
- Tubos plásticos de 50 mL y 15 mL libres de ARNAsas
- Microtubos de 1,5 mL libres de ARNAsas

Preparación de soluciones de trabajo

- Solución de extracción de ARN:

Isotiocianato de guanidinio 14,18 g (concentración final 4 M)

Citrato de sodio 0,16 g (concentración final 25 mM)

Sarcosil 0,15 mL (concentración final 0,5 %)

Agua DEPC esterilizada c.s.p. 30 mL

Puede conservarse a 4 °C. En este caso adicionar β -mercaptoetanol, a una concentración final de 100 mM, justo antes de ser utilizada.

- Acetato de potasio 3 M pH 4:

Pesar 294 g de acetato de potasio y disolverlo en 100 mL de agua tratada con DEPC y estéril. Ajustar el pH a 4. Esterilizar y conservar a 4 °C.

- Cloroformo:alcohol isoamílico (24:1):

La proporción es de 24 partes a 1 parte. Mezclar 24 mL de cloroformo con 1 mL de alcohol isoamílico. Se pueden preparar volúmenes mayores respetando dicha proporción.

Conservar a temperatura ambiente.

- Etanol 70 %:

Etanol absoluto 70 mL

Agua DEPC estéril c.s.p. 100 mL

- TE 1 (Tris-HCl/EDTA):

Tris 1 M 1 mL (concentración final 10 mM o 0,01 M)

EDTA 0,5 M 0,2 mL (concentración final 1 mM o 0,001 M)

Agua DEPC estéril c.s.p. 100 mL

Ajustar a pH 8, esterilizar y conservar a 4 °C.

Procedimiento

5. Colocar 100 o 150 μ L de sangre entera anticoagulada con EDTA en un microtubo de 1,5 mL. El volumen puede reducirse hasta 50 μ L. Mantener todos los reactivos y la muestra en baño con hielo.
6. Adicionar a la muestra 9 o 10 volúmenes (aproximadamente 1 mL) de solución de ARN. Si se parte de 50 μ L de sangre, adicionar 500 μ L de esta solución. Homogeneizar.
7. Agregar 1 volumen de acetato de sodio o potasio 3 M pH 4, preparado con agua tratada con DEPC. Mezclar con vórtex.
8. Adicionar 2 volúmenes de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). Se puede utilizar fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1). Mezclar con vórtex e incubar en baño de hielo durante 10 a 15 minutos.
9. Centrifugar por 10 minutos a 12.000 rpm en una microcentrífuga refrigerada a 4 °C. Transferir el sobrenadante a un microtubo nuevo libre de ARNsas. Los pasos 4 y 4 se pueden repetir una vez más.
10. Precipitar el ARN aislado adicionando 1 mL de isopropanol (invertir 3 o 4 veces) y dejar precipitar entre 20 minutos y 1 hora a -20 °C. Eventualmente dejar precipitando a -20 °C durante toda la noche.
11. Centrifugar a 14.000 rpm por 10 minutos. Descartar el sobrenadante y lavar con 1 mL de etanol 70 % preparado con agua tratada con DEPC y autoclavada.

12. Centrifugar a 12.000 rpm durante 5 minutos y extraer todo el alcohol. Dejar secar a temperatura ambiente.
13. Resuspender en TE 1 pH 8 o en agua tratada con DEPC autoclavada.
14. Conservar a -20 °C; para almacenamiento más prolongado, conservar a -70 °C.

Protocolo de extracción de ARN total a partir de sangre entera utilizando un *kit* comercial

Este protocolo resume los pasos a seguir empleando el reactivo Trizol™ de la empresa Invitrogen. Este es un agente listo para usar, que consiste en una solución monofásica de isotiocianato de guanidinio y fenol, de utilidad en el aislamiento tanto de ARN total como de DNA o proteínas. Su fundamento se basa en el método desarrollado por Chomczynski y Sacchi (1987), reduciendo el proceso de extracción y purificación a un solo paso general (*single-step method*). Las muestras que pueden ser utilizadas son variadas, tanto procariotas como eucariotas. La proporción aproximada es de 1 mL de reactivo para el aislamiento de ARN total de hasta 100 mg de tejido o 1×10^7 células. Este reactivo también es útil para el aislamiento de ARN vírico presente en suero o plasma.

Muestra: al igual que en el protocolo anterior, se parte de muestra de sangre entera anticoagulada con EDTA y heparina.

Equipamientos y materiales: se utilizarán los mismos que en el protocolo anterior.

Procedimiento

15. Mantener todos los reactivos y la muestra, en el baño con hielo.
16. Colocar 300 μ L de plasma obtenido con EDTA en un microtubo de 1,5 mL. Adicionar 1 μ L de ARNt de levadura (yeast tRNA) que actuará como *carrier* arrastrando las cantidades mínimas de RNA que puedan ser recuperadas, aumentando de este modo el rendimiento de la técnica.
17. Agregar 300 μ L del reactivo comercial Trizol™ (Invitrogen). Mezclar con vórtex por 5 segundos.
18. Adicionar 100 μ L de cloroformo. Mezclar con vórtex durante 5 segundos.
19. Incubar 2 minutos a temperatura ambiente.
20. Centrifugar 5 minutos a 12.000 rpm en una microcentrífuga refrigerada a 4 °C.
21. Transferir la fase acuosa superior a un nuevo microtubo libre de ARNasas.
22. Precipitar el ARN obtenido con 1 mL de isopropanol. Incubar 10 minutos a temperatura ambiente.

23. Centrifugar a 14.000 rpm por 5 minutos.
24. Lavar el ácido nucleico obtenido con 1 mL de etanol 70 % preparado con agua DEPC.
25. Eliminar todo el etanol y secar los microtubos boca abajo sobre papel absorbente.
26. Resuspender en 100 μ L de agua DEPC o en TE 1 preparado con agua tratada con DEPC y estéril.
27. Conservar a -20 °C; para almacenamiento más prolongado, conservar a -70 °C.

ANEXO 1.3. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES MADRE PARA EXTRACCIÓN DE ADN

- **Tris-HCl 1 M pH 7,4:**
Pesar 12,11 g de Tris y disolverlo en 100 mL de agua destilada.
Ajustar a pH 7,4 con HCl concentrado.
Esterilizar y conservar a 4 °C.
- **EDTA 0,5 M pH 8,0:**
Pesar 93,05 g de EDTA y disolver en 500 mL de agua destilada.
Ajustar a pH 8 con granallas de NaOH.
Esterilizar y conservar a 4 °C.
- **NaCl 5 M:**
Pesar 2,34 g de NaCl y disolver en 40 mL de agua destilada en un tubo estéril de 50 mL.
Esterilizar y conservar a 4 °C.
- **CTAB 20 %:**
Disolver 8 g de CTAB en 40 mL de agua destilada en un tubo de 50 mL nuevo. Calentar en baño termostático para favorecer su disolución. Mantener a temperatura ambiente.
- **SDS 20 %:**
Disolver 8 g de SDS en 40 mL de agua destilada en un tubo de 50 mL nuevo en baño termostático para favorecer su disolución.
Conservar a temperatura ambiente.



POSADAS, 27 SEP 2019

VISTO el Expediente FCEQYN_EXP-S01:0002581/2019, referente al Programa de la asignatura Biología Molecular de la carrera Profesorado Universitario en Biología; y

CONSIDERANDO:

Que el Consejo Departamental del Departamento de Biología eleva el Programa de la asignatura Biología Molecular de la carrera Profesorado Universitario en Biología.

Que la Secretaría Académica toma conocimiento del trámite y eleva al Presidente del Consejo Directivo para su tratamiento.

Que la comisión de Asuntos Académicos emite el despacho N° 194/19 en el que expresa: "Se sugiere APROBAR el Programa de la asignatura BIOLOGIA MOLECULAR de la carrera PUB".

Que el tema se pone a consideración en la VIIª Sesión Ordinaria de Consejo Directivo realizada el 09 de septiembre de 2019, aprobándose por unanimidad de los consejeros presentes el despacho N° 194/19 de la comisión de Asuntos Académicos.

Por ello,

**EL CONSEJO DIRECTIVO DE LA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, QUÍMICAS Y NATURALES
RESUELVE:**

ARTÍCULO 1º- APROBAR por el período 2019-2022, el Programa de la asignatura **BIOLOGIA MOLECULAR** de la carrera Profesorado Universitario en Biología, el que se incorpora como Anexo de la presente Resolución.

ARTÍCULO 2º - REGISTRAR. Notificar al Señor Decano. Comunicar. Cumplido. ARCHIVAR.

RESOLUCION CD N° 462-19
MLE

Mgter. María Celina VEDOYA
Secretaría Consejo Directivo
Facultad de Ciencias Exactas,
Químicas y Naturales

Dr. Marcelo Julio MARINELLI
Presidente Consejo Directivo
Facultad de Ciencias Exactas,
Químicas y Naturales

VISTO: se deja expresa constancia que en la fecha se tomó conocimiento de la Resolución N°..... del Honorable Consejo Directivo de la FCEQYN de conformidad al Art. 1º inciso "c" de la Ordenanza N° 001/97.

27 SEP 2019

Dr. Luis Alberto BRUMOVSKY
Decano
Facultad de Ciencias Exactas,
Químicas y Naturales



ANEXO RESOLUCION CD Nº 462-19 .-

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE MISIONES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, QUÍMICAS Y NATURALES**

Período: 2019

PROGRAMA DE: **BIOLOGÍA MOLECULAR**

CARRERA: **PROFESORADO UNIVERSITARIO EN BIOLOGÍA**

AÑO EN EL QUE SE DICTA: 4^{to} año

PLAN DE ESTUDIO (año de aprobación): 2016

CARGA HORARIA: 75 h

PORCENTAJE DE FORMACIÓN TEORICA: 65

PORCENTAJE DE FORMACION PRACTICA: 35

DEPARTAMENTO: BIOLOGIA

PROFESOR TITULAR/Responsable de la Asignatura: MARIA ISABEL FONSECA

CARGO Y DEDICACIÓN: PROFESOR ADJUNTO (SIMPLE)

| EQUIPO DE CATEDRA | CARGO Y DEDICACIÓN |
|-----------------------------|---|
| 1º MARIA ISABEL FONSECA | Prof. Adjunto – Simple (con afectación) |
| 2º MARIA MERCEDES TISCORNIA | JTP - Semiexclusiva (con afectación) |
| 3º ERNESTO MARTIN GIORGIO | Auxiliar de Primera - Simple |

| RÉGIMEN DE DICTADO | | RÉGIMEN DE EVALUACIÓN |
|--|--|--|
| Anual <input type="checkbox"/> | Cuatrimstre 1º <input checked="" type="checkbox"/> | Promocional |
| Cuatrimstral <input checked="" type="checkbox"/> | Cuatrimstre 2º <input type="checkbox"/> | SI <input checked="" type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> |

Atención: Marcar según corresponda con una "x"

OTRAS CARRERAS EN LAS QUE SE DICTA LA MISMA ASIGNATURA

| Denominación Curricular | Carreras en que se dicta | Año del Plan de Estudios |
|-------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 1º ----- | ----- | ----- |
| 2º ----- | ----- | ----- |
| 3º ----- | ----- | ----- |
| 4º ----- | ----- | ----- |
| 5º ----- | ----- | ----- |
| 6º ----- | ----- | ----- |
| 7º ----- | ----- | ----- |
| 8º ----- | ----- | ----- |

Mgtr. MARIA CEIINA VEDOYA
SECRETARIA DEL CONSEJO DIRECTIVO
FCEQyN - UNaM

Dr. MARCELO JULIO MARINELLI
PRESIDENTE CONSEJO DIRECTIVO
FCEQyN - UNaM

Dr. Maria Isabel Fonseca
DOCENTE - INVESTIGADORA



ANEXO RESOLUCION CD Nº

462-19

PROGRAMA 2019

Asignatura **BIOLOGIA MOLECULAR**

| CRONOGRAMA | TEORIA | TRABAJOS PRÁCTICOS |
|--|--|--|
| | Unidad 1: 1 clase (1º semana) Unidad 2: 2 clases (1º y 2º semanas) Unidad 3: 2 clases (3º y 4º semanas) | |
| | 1º PARCIAL DE TP / RECUPERATORIO 1º PARCIAL DE PROMOCIÓN DE TEORÍA / RECUPERATORIO 5 y 6º Semana | |
| Unidad 4: 2 clases (7º y 8º semanas) Unidad 5: 2 clases (9º y 10º semana) Unidad 6: 2 clases (11º y 12º semanas) Unidad 7: 1 clase (13º semana) | | Taller-Trabajo Práctico Nº 3: Métodos de amplificación: PCR. (7º semana) TP Nº 3: Métodos de amplificación: PCR. (8º semana) Taller-Trabajo Práctico Nº 4: Análisis proteico por métodos electroforéticos. (9º semana) TP Nº 4: Análisis proteico por métodos electroforéticos. (10º semana) Taller-Trabajo Práctico Nº 5: Bioinformática (11º semana). Taller-Trabajo Práctico Nº 6: Biomedicina (12º semana). Taller-Trabajo Práctico Nº 7: Tecnología del DNA recombinante (13º semana). |
| | 2º PARCIAL DE TP / RECUPERATORIO 2º PARCIAL DE PROMOCIÓN DE TEORÍA/ RECUPERATORIO 14º y 15º Semana | |

Mgter. **MARÍA CEITINA VEDDOYA**
SECRETARIA DEL CONSEJO DIRECTIVO
FCEQyN - UNaM

Dr. **MARCELO JUNIO MARINELLI**
PRESIDENTE CONSEJO DIRECTIVO
FCEQyN - UNaM

Dra. **María Isabel Fonseca**
DOCENTE - INVESTIGADORA
UNaM - COMISET



ANEXO RESOLUCION CD Nº 462-19..

| | |
|-----------------------|---|
| FUNDAMENTACIÓN | <p>La Biología Molecular es el estudio de los procesos biológicos a través de una metodología que permite lograr un abordaje molecular.</p> <p>El estudio de esta signatura le proporciona al alumno una visión más detallada de los procesos biológicos, completando el estudio iniciado en asignaturas anteriores (Biología Celular, Química Biológica y Genética), mediante un enfoque molecular de los procesos y las alteraciones que se producen por fallos en éstos. La metodología aplicada para este estudio es excepcional, por ello mediante su manejo y análisis el alumno se familiarizará con nuevas técnicas, pudiendo comprender sus fundamentos y la utilidad de las mismas a las diversas ramas de la biología.</p> |
| OBJETIVOS | <p>Objetivos generales</p> <ul style="list-style-type: none">- Capacitar al alumno en el conocimiento e interpretación de los procesos biológicos desde un punto de vista molecular, así como en la metodología que se utiliza para su estudio. <p>Objetivos particulares</p> <ul style="list-style-type: none">- Integrar los conocimientos biológicos básicos analizándolos desde un enfoque molecular.- Facultar en el reconocimiento del alcance y las utilidades de la tecnología molecular, asumiendo una actitud crítica, ética y profesional en su aplicación.- Capacitar para la aplicación de los conocimientos adquiridos y los avances metodológicos en las distintas áreas de la biología.- Brindar un enfoque molecular de los diferentes procesos biológicos y su relación con la patología humana. |

Mgtr. MARIA CELINA VEDOYA
SECRETARIA DEL CONSEJO DIRECTIVO
FCEQyN - UNaM

Dr. MARCELO JULIO MARINELLI
PRESIDENTE CONSEJO DIRECTIVO
FCEQyN - UNaM

Dra. María Isabel Fonseca
DOCENTE - INVESTIGADORA
UNaM - CONICET



ANEXO RESOLUCION CD Nº **462-19**

| | |
|------------------------------|--|
| CONTENIDOS MINIMOS | Estructura y organización del genoma en células procariotas y eucariotas. La estructura y la función de los genes. Genomas virales. Variabilidad y genómica. Replicación y reparación del ADN. Transcripción y control de la expresión génica. Traducción y modificaciones post-traduccionales de las proteínas. Los mecanismos de regulación génica. Alteraciones físicas y moleculares de los procesos celulares. Cáncer. La Biotecnología y las herramientas de biología molecular. Tecnología del ADN recombinante. Métodos de transformación genética de bacterias, levaduras, plantas, mamíferos. Terapia génica. Clonación. Organismos genéticamente modificados. Consideraciones jurídicas y éticas. |
| MODULOS | La asignatura se divide en cuatro módulos: Módulo 1: Unidades 1 y 2 Módulo 2: Unidades 3, 4 y 5 Módulo 3: Unidad 6 Módulo 4: Unidad 7 |
| CONTENIDOS POR UNIDAD | Unidad 1: Introducción a la biología molecular Concepto de biología molecular y aplicaciones a diferentes ramas de la ciencia. Dogma central de la genética molecular. Fundamentos moleculares y celulares de la herencia: Relación entre la genética molecular y mendelina. Estructura primaria y secundaria del DNA: Modelo de Watson y Crick. Reglas de Chargaff. Consecuencias evolutivas y hereditarias del modelo. Variaciones en la estructura secundaria del DNA: Forma Z y forma A del DNA. Estructura del ARN. Variaciones locales. Palíndromos. Condensación del DNA y cromosomas: Superenrollamiento. Proteínas de la cromatina. Niveles de condensación del DNA eucariota. Preparación de muestras, extracción y análisis de ácidos nucleicos: Muestras usadas. Métodos de extracción de DNA y RNA. Cuantificación de ácidos nucleicos. Fraccionamiento de DNA o RNA mediante electroforesis, ultracentrifugación y cromatografía. Unidad 2: Genómica Estructura y organización del genoma en células procariotas y eucariotas. Genomas virales. Comparación. Medición. Organización del genoma en eucariotas: DNA de copia única. DNA repetitivo codificante. DNA repetitivo no codificante. Estudio del cromosoma en metafase: Morfología cromosómica. Cariotipo. Función del centrómero y de los telómeros. Marcadores genéticos. Secuenciación del genoma: Método químico. Método enzimático. Problemas. Proyectos genoma: PGH y otros. Genómica comparativa. Variabilidad y genómica. Polimorfismos: Concepto de individualidad genética. |

Mgter. MARIA CUNYA VEDOYA
SECRETARIA DEL CONSEJO DIRECTIVO
FCEQYN - UNaM

Dr. MARCELO JUNIO MARINELLI
PRESIDENTE CONSEJO DIRECTIVO
FCEQYN - UNaM

ANEXO RESOLUCION CD Nº 462-19

Mecanismos implicados en la generación de diversidad. Polimorfismos de regiones codificantes. Polimorfismo de regiones no codificantes. Estudio del genoma. Detección de polimorfismos y aplicaciones.

Unidad 3: Bases moleculares de la replicación

Replicación del DNA: Características generales. Diferencias entre procariontes y eucariotes. Enzimología. Etapas. Bases moleculares de la mutación y la reparación del DNA: Concepto de mutación. Tipos de mutaciones. Causas y mecanismos de mutaciones. Mecanismos de reparación. Transferencia e hibridación de ácidos nucleicos: Desnaturalización y renaturalización del DNA. Principio de la hibridación. Tipos de hibridación. Hibridación en soportes sólidos. Sondas: Definición. Preparación y marcaje. Usos. Reacción en cadena de la polimerasa: Principio. Etapas. Variantes. Usos.

Unidad 4: Bases moleculares de la transcripción

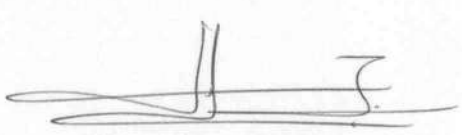
Aspectos moleculares de la transcripción: Estructura y función de los genes. Características generales. Diferencias entre procariontes y eucariotes. Enzimología. Etapas. Control de la expresión génica pretranscripcional y transcripcional: Puntos de control durante el flujo de la información génica. Control pretranscripcional. Elementos reguladores en cis y trans. Motivos estructurales responsables de la interacción con el DNA. Tipos de promotores. Regulación del inicio en promotores tipo II. Factores de transcripción inducibles. Regulación del inicio en promotores tipo I y III. Regulación epigenética. Maduración y procesamiento del RNA: Características del proceso. Papel de las ribonucleoproteínas. Modificaciones de los extremos. *Splicing*. Procesamiento de los RNA de transferencia y ribosómicos. Diferencias entre eucariotes y procariontes. Controles. Retrotranscripción. Métodos de estudio de la expresión génica: Ensayos de DNasa.

Unidad 5: Bases moleculares de la traducción


Código genético: Estructura del RNA. Propiedades del código genético. Degeneración del código genético. Aspectos moleculares de la traducción: Características generales. Estructura de los ribosomas. Activación del aminoacil-tRNA. Etapas de la traducción. Regulación. Modificaciones postraduccionales: Maduración. Plegamiento de proteínas. Degradación de proteínas. Tráfico y destino de proteína: Proteínas citosólicas. Proteínas de orgánulos. Proteínas de secreción. Métodos moleculares para el estudio de proteínas.

Unidad 6: Bases moleculares del ciclo celular

Ciclo celular: Etapas del ciclo celular. Control del ciclo celular.



Mgter. MARIA CEJINA VEDOYA
SECRETARIA DEL CONSEJO DIRECTIVO
FCEQyN - UNaM



Dr. MARCELO JULIO MARINELLI
PRESIDENTE DEL CONSEJO DIRECTIVO
FCEQyN - UNaM





ANEXO RESOLUCION CD Nº 462-19

| | |
|----------------------------|--|
| | <p>Ciclinas y kinasas dependientes de ciclina. Acontecimientos del ciclo celular. Papel de Rb y p53. Desarrollo y diferenciación: Nociones generales y papel de los genes maestros. Muerte celular: Apoptosis y necrosis. Etapas del proceso de apoptosis. Regulación. Principios de patología molecular: Enfermedades moleculares. Clasificación y características. Bases moleculares del cáncer. Etapas. Oncogenes y genes supresores de tumores. Marcadores tumorales.</p> <p>Unidad 7: Aplicaciones de la biología molecular.</p> <p>La Biotecnología y las herramientas de biología molecular. Organismos genéticamente modificados. Tecnología del DNA recombinante: Enzimas utilizadas. Enzimas de restricción. Vectores. Métodos de transformación genética de bacterias, levaduras, plantas, mamíferos. Genotecas. Terapia génica. Consideraciones jurídicas y éticas.</p> |
| ESTRATEGIAS DE APRENDIZAJE | <p>1- Teoría: desarrollo de contenidos conceptuales será a través de clases del tipo expositivo dialogado de cada una de las unidades del programa. Presentación del tema, discusión y profundización de diferentes aspectos con participación del alumno en base a material aportado por la cátedra. Resumen temático de tipo expositivo con participación del alumno.</p> <p>2- Taller y Trabajos Prácticos de Laboratorio: desarrollo de contenidos procedimentales propios de la biología molecular.</p> <p>3- Clases de Consultas: destinadas a resolver y esclarecer dudas relacionadas a todos los aspectos del programa de la asignatura.</p> |
| SISTEMA DE EVALUACIÓN | <p>1. Parciales de Promoción de TP (2 y 2 recuperatorios) 2. Parciales de Promoción de la Materia (Teoría) (2 y 2 recuperatorios)</p> <p>Nota: Para el adecuado desarrollo de los contenidos propios de la materia el alumno deberá manejar contenidos previos que serán evaluados de manera diagnóstica durante cada clase.</p> |
| REGLAMENTO DE CÁTEDRA | <p><u>Serán condiciones para cursar:</u> Estar en condición de cursar la asignatura con TODAS las correlatividades cumplidas según lo indica en el plan vigente. La cátedra NO ACEPTARÁ ningún tipo de condicionalidad.</p> <p>La evaluación de los alumnos será permanente a través de varias instancias: corrección de los trabajos prácticos e informes (aprobado/desaprobado), en proceso durante la discusión; en instancia escrita u oral en los cuatro (4)</p> |

Mgter. MARIA CEJINA VEDOYA
SECRETARIA DEL CONSEJO DIRECTIVO
FCEQyN - UNaM

Dr. MARCELO J. MARINELLI
PRESIDENTE DEL CONSEJO DIRECTIVO
FCEQyN - UNaM

Dra. María Isabel Encarni

ANEXO RESOLUCION CD Nº

462-19

exámenes parciales previstos, siendo dos parciales de teoría y dos de trabajos prácticos.

A- RÉGIMEN DE DICTADO

El desarrollo de la asignatura está definida por un régimen cuatrimestral distribuido de la siguiente manera:

Clases obligatorias Su asistencia se contabilizará de manera separada debiendo alcanzarse el 80% de asistencia en cada una.

- **Teoría:** desarrollo de contenidos conceptuales de cada una de las unidades del programa.
- **Taller de trabajos prácticos y Trabajos Prácticos de Laboratorio:** desarrollo de contenidos conceptuales y procedimentales propios de la biología molecular.

Modalidad y frecuencia de las clases:

La asignatura contará con 2 clases obligatorias semanales, una de teoría y la otra alternándose clases de taller con trabajos prácticos de laboratorio.

- ☆ **Teoría:** serán de 2 h de duración. Presentación del tema, discusión y profundización de diferentes aspectos con participación del alumno en base a material aportado por la cátedra. Resumen temático de tipo expositivo con participación del alumno. Estarán a cargo de los Profesores, aunque participarán de ellas también los Auxiliares de la cátedra.
- ☆ **Taller y Trabajos Prácticos de Laboratorio:** serán de 3 h de duración, en la que se desarrollan los aspectos prácticos de la metodología aplicada en biología molecular. Será obligación del alumno entregar los informes por escrito.

Consultas: tanto para aspectos teóricos como prácticos, estarán a cargo de los diferentes miembros del equipo docente de acuerdo a la función asignada por el Jefe de Cátedra y a su dedicación docente.

B-RÉGIMEN DE CURSADO

Al finalizar el cursado se reconocerán dos categorías de alumnos: REGULAR y LIBRE.

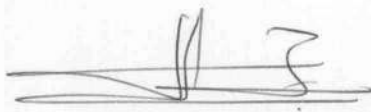
1-Regular

Serán considerados alumnos regulares quienes tengan una asistencia y aprobación del 80% de los trabajos prácticos, y aprueben 2 (dos) parciales escritos (contenidos teóricos y

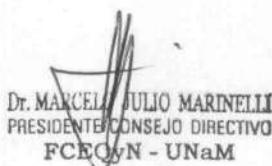
ANEXO RESOLUCION CD Nº **462-19**

| | |
|--|---|
| | <p>prácticos) con un puntaje mínimo del 60%, cada uno de los parciales tendrá su respectivo recuperatorio.</p> <p>2-Libre: Será considerado alumno libre aquel que no cumple con las condiciones requeridas de alumno regular. Deberá rendir un examen de laboratorio que consistirá en el desarrollo de trabajos prácticos, debiendo mostrar habilidades en manejo de microscopio, técnicas de laboratorio y desarrollo de experiencias, una evaluación teórico-práctica que será escrita u oral y un examen teórico.</p> <p>SISTEMA APROBACIÓN Aprobación por Promoción El alumno que cumpla con los requisitos de regularidad, podrá promocionar la materia durante la cursada, por la aprobación de 2 (dos) evaluaciones escritas u oral (dependiendo de la cantidad de alumnos) que versara de contenidos teóricos con un mínimo del 70% (seis), ambas evaluaciones contarán con su respectivo recuperatorio. El alumno que cumpla con todos los requisitos citados más arriba alcanzará la promoción completa de la Asignatura.</p> <p>Renuncia de la Regularidad: La cátedra NO ACEPTARA la renuncia a la regularidad.</p> |
|--|---|

| | |
|--|--|
| <p>BIBLIOGRAFÍA OBLIGATORIA</p> | <ul style="list-style-type: none"> ☆ Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter D. <i>Biología Molecular de la Célula</i>. Editorial Omega, Barcelona. 1996. ☆ Alberts, Bruce; Johnson, Alexander; Lewis, Julian; Raff, Martin; Roberts, Keith; Walter, Peter <i>Molecular Biology of the Cell</i>. 4th ed. New York: Garland Publishing; 2002. ☆ Cariaga-Martinez AE y Zapata PD. <i>El laboratorio de Biología Molecular: una guía práctica</i>. Edición ampliada. Posadas: Editorial Universitaria de Misiones, Serie Cátedra. 2007. pag.160. isbn 978-950-579-073-9 ☆ Genes and Disease. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), NCBI ☆ Lodish, Berk, Zipursky, Matsudaira, Baltimore, Darnell. <i>Biología Celular y Molecular 4º edición</i>. Editorial Panamericana. Buenos Aires 2001. ☆ Luque J, Herráez A. <i>Biología Molecular e Ingeniería Genética</i>. Editorial Harcourt, Madrid. 2001. ☆ Sambrook J, Russell D. <i>Molecular Cloning: A Laboratory Manual</i>. Cold Spring Harbor Laboratory Press. |
|--|--|



Mgter. MARIA CEJINA VEJOYA
 SECRETARÍA DEL CONSEJO DIRECTIVO
 FCEQyN - UNaM



Dr. MARCELA JULIO MARINELLI
 PRESIDENTE DEL CONSEJO DIRECTIVO
 FCEQyN - UNaM



Dra. María Isabel Fonseca
 DOCENTE - INVESTIGADORA
 UNaM

ANEXO RESOLUCION CD Nº 462-19

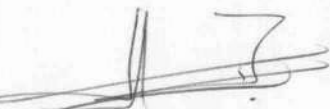
BIBLIOGRAFIA
COMPLEMENTARIA

- ☆ Becker J. Biotecnología: curso de practicas de laboratorio. Editorial Acribia
- ☆ Berg, Jeremy M.; Tymoczko, John L.; and Stryer, Lubert. Biochemistry 5º ed. New York: W. H. Freeman and Co.; 2002.
- ☆ Brown, T. A. Genomes. 2nd ed. Oxford, UK: BIOS Scientific Publishers Ltd; 2002.
- ☆ Claros MG, Avila C, Gallardo F, Cánovas FM. Bioquímica Aplicada: Manual para el diseño experimental y el análisis de datos en Bioquímica y Biología Molecular. Septem ediciones
- ☆ Cooper, Geoffrey M. The Cell - A Molecular Approach. 2nd ed. Sunderland (MA): Sinauer Associates, Inc.; c2000.
- ☆ Cox M, Sinclair. *Biología Molecular en Medicina*. Editorial Panamericana, Bs. As.
- ☆ De Robertis E, Hib J, Poncio R. *Biología Celular y Molecular*. Editorial El Ateneo. Bs.As.1997.
- ☆ Griffiths AJ, Gelbart W, Miller J, Lewontin R. *Genética Moderna*. Int. MacGraw-Hill, Madrid, 2000.
- ☆ Gilbert, Scott F. Developmental Biology. 6th ed. Sunderland (MA): Sinauer Associates, Inc.; c2000.
- ☆ Janeway, Charles A.; Travers, Paul; Walport, Mark; Shlomchik, Mark. Immunobiology. 5th ed. New York and London: Garland Publishing; c2001.
- ☆ Kufe, Donald W.; Pollock, Raphael E.; Weichselbaum, Ralph R.; Bast, Robert C., Jr.; Gansler, Ted S.; Holland, James F.; Frei III, Emil, editors. Cancer Medicine. 6th ed. Hamilton (Canada): BC Decker Inc.; c2003
- ☆ Lehninger A, Nelson D, Cox M. *Principios de Bioquímica*. Editorial Omega, Madrid. 1995.
- ☆ Lewin B. *Genes VII*. Oxford Univ. Press, Oxford. 2000.
- ☆ Mathews CK, van Holde KE, Ahern KG. Biochemistry 3ª Edición. Editorial Addison Wesley Longman
- ☆ Mueller R, Young I. *Genética Medica*. Editorial Marban. Madrid.
- ☆ Purves, Dale; Augustine, George J.; Fitzpatrick, David; Katz, Lawrence C.; LaMantia, Anthony-Samuel; McNamara, James O.; Williams, S. Mark. Neuroscience. 2nd ed. Sunderland (MA): Sinauer Associates, Inc.; 2001.
- ☆ Singer M, Berg P. *Genes y Genomas. Una perspectiva cambiante*. Editorial Omega. Barcelona.
- ☆ Strachan, Tom and Read, Andrew P. Human Molecular Genetics 2. 2nd ed. Oxford, UK: BIOS Scientific Publishers Ltd; 1999.
- ☆ Stryer L. *Bioquímica 4º edición*. Editorial Reverté, Barcelona. 1995.
- ☆ The NCBI Handbook. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), NCBI; 2002 Nov.

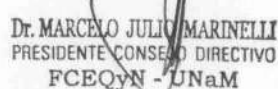


Dra. Fonseca María Isabel

Dra. María Isabel Fonseca



Mgter. MARIA CEJINA VEJOYA
SECRETARÍA DEL CONSEJO DIRECTIVO
FCEQyN - UNaM



Dr. MARCELO JULIO MARINELLI
PRESIDENTE CONSEJO DIRECTIVO
FCEQyN - UNaM