

EAP

0394(55)

# ódulo de Diagnóstico Molecular

Laboratorio de Biotecnología del PIF

ESCUELA WILSON POPENON  
ESCUELA AGRICOLA PANAMERICANA  
APARTADO 93  
TESUGUALPA HONDURAS



Carrera de Ciencia y Producción Agropecuaria  
Escuela Agrícola Panamericana  
Zamorano, Honduras.

Recopilado por:  
Marcelino Guachambala, Ing. Agr.  
Juan Carlos Rosas, Ph. D.



cpa

Carrera de Ciencia  
y Producción Agropecuaria



212500

El presente manual es una contribución a la formación de los estudiantes de la Escuela Agrícola Panamericana Zamorano (EAP), dentro del Aprender Haciendo, uno de los pilares de la formación Zamorana. El manual pretende ser una guía práctica en el aprendizaje del diagnóstico de genes de resistencia y de patógenos.

El manual contiene información básica sobre el diagnóstico, tipos de diagnóstico, Ácido Desoxiribonucleico, Reacción en Cadena de la Polimerasa, electroforesis, marcadores y tipos de marcadores.

**BIBLIOTECA WILSON POTENOR**  
**ESCUELA AGRÍCOLA PANAMERICANA**  
**APARTADO 09**  
**TEGUIGALPA HONDURAS**

# Índice

<b>I. DIAGNÓSTICO</b> .....	7
1. Principales microorganismos y entes biológicos diagnosticados en plantas y animales. ....	7
1.1. Hongos .....	7
1.1.1. Características .....	7
1.1.2. Importancia .....	7
1.2. Cromistas .....	7
1.2.1. Características .....	7
1.2.2. Importancia .....	7
1.3. Bacterias .....	8
1.3.1. Características .....	8
1.3.1.1 Reproducción asexual .....	8
1.3.1.2 Reproducción sexual .....	8
1.3.2. Importancia .....	8
1.4. Micoplasmas .....	8
1.4.1. Características .....	9
1.4.2. Importancia .....	9
1.5. Virus .....	9
1.5.1. Características .....	9
1.5.2. Importancia .....	9
1.6. Priones .....	10
1.6.1. Características .....	10
1.6.2. Importancia .....	10
2. Diagnóstico .....	10
2.1. Tipos de Diagnóstico .....	11
2.1.1. Diagnóstico Convencional .....	11
2.1.1.1 Postulados de Koch .....	11
2.1.2. Diagnóstico Serológico .....	12
2.1.3. Diagnóstico Molecular .....	14
<b>II. PRINCIPIOS DE BIOSEGURIDAD</b> .....	16
1. Prácticas y técnicas de laboratorio .....	16
2. Niveles de bioseguridad (NBS) .....	16
2.1. Nivel de bioseguridad 1 (NBS 1) .....	16
2.2. Nivel de bioseguridad 2 (NBS 2) .....	16
2.3. Nivel de bioseguridad 3 (NBS 3) .....	16
2.4. Nivel de bioseguridad 4 (NBS 4) .....	17
3. Equipo de protección personal básico (EPP) .....	17
4. Práctica # 1. Regulaciones de conducta y Bioseguridad .....	17
5. Práctica # 2. Lista de chequeo de Seguridad .....	19

<b>III. El ADN</b>	21
1. Introducción	21
2. Propiedades físicas y químicas	24
3. Estructura del ADN	21
4. Estructura tridimensional del ADN	23
4.1. Estructura primaria	23
4.2. Estructura secundaria	23
4.3. Estructura terciaria	25
4.3.1. Cromatina	25
4.3.2. La eucromatina	25
4.3.3. La heterocromatina	25
4.3.3.1. Heterocromatina constitutiva	25
4.3.3.2. Heterocromatina facultativa	25
4.3.4. El nucleosoma	25
4.3.4.1. El núcleo	25
4.4. Estructura cuaternaria	26
4.5. Estructura en cuádruplex	26
4.5.1. Los telómeros	26
5. Duplicación del ADN	27
6. Dogma Central de la Biología Molecular	27
7. Código Genético	28
8. Genes y Genoma	28
9. Práctica # 1. Regulaciones en los procesos para el diagnóstico molecular	29
10. Práctica # 2. Extracción de ADN. Protocolo de Extracción de ADN	30
<b>IV.- REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)</b>	31
1. Introducción	31
2. Reactivos para llevar a cabo una PCR	31
2.1. Agua desionizada y destilada (ddH <sub>2</sub> O)	31
2.2. Solución amortiguadora de pH o Buffer	31
2.3. Ión magnesio (MgCl <sub>2</sub> )	31
2.4. Desoxinucleótidos trifosfatos (dNTP's)	31
2.5. Cebadores, iniciadores, imprimadores o primers	31
2.6. ADN polimerasa. Taq polimerasa	31
2.7. ADN template o molde	31
3. Fases de la PCR	32
3.1. Desnaturalización del ADN	
3.2. Acoplamiento o apareamiento de los primers	33
3.3. Síntesis, extensión o elongación	33
4. Práctica #1. Cuantificación y Dilución de ADN	34
5. Regulaciones de bioseguridad durante el proceso de cuantificación de ADN	34
6. Práctica # 3. Amplificación de ADN	35
7. Regulaciones para el trabajo dentro de la cámara de flujo laminar	35
8. Riesgos	35

<b>V.- ELECTROFORESIS</b> .....	<b>36</b>
1. Introducción .....	36
2. Tipos de electroforesis .....	36
3. Siembra o cargado del producto de PCR .....	36
3.1 La escalera molecular .....	37
3.2. El control positivo .....	37
3.4. El control negativo .....	37
4. Ejercicios. Fotos de geles de electroforesis para práctica .....	38
5. Práctica # 1. Electroforesis .....	39
6. Regulaciones para el trabajo en las cisternas de electroforesis .....	39
7. Regulaciones para el teñido de geles de agarosa y el uso del transiluminador UV .....	39
<b>VI.- MARCADORES</b> .....	<b>40</b>
1. Introducción .....	40
2. Marcadores Morfológicos .....	40
3. Marcadores Bioquímicos .....	40
4. Marcadores Moleculares .....	41
4.1. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) .....	41
4.2. Sequence Characterized Amplified Region (SCAR) .....	42
4.2.1. Generación de marcadores tipo SCAR .....	42
<b>VII.- GLOSARIO</b> .....	<b>44</b>
<b>VIII.- ANEXOS</b> .....	<b>49</b>
1. Anexo 1. Materiales y equipo básico .....	49
2. Anexo 2. Medidas generales de Primeros Auxilios Básicos (PAB) .....	49
<b>LITERATURA CONSULTADA</b> .....	<b>50</b>

Aprender diagnóstico molecular basado en marcadores moleculares tipo RAPD (Polimorfismos de ADN Amplificados al Azar) y SCAR (Regiones Amplificadas y Caracterizadas por Secuencia), sus aplicaciones y utilidades.

## I. DIAGNÓSTICO

Objetivos específicos:

Conocer los principales tipos de patógenos de las plantas y animales. Conocer los tipos de diagnóstico y sus principales características. Aprender a utilizar el tipo de diagnóstico requerido de acuerdo al agente causal de una enfermedad. Conocer los principios de bioseguridad para poder trabajar en el laboratorio de biotecnología aplicada de la EAP Zamorano. Conocer el manejo y procesamiento de las muestras sometidas a diagnóstico molecular, bajo normas de bioseguridad.

### 1. Principales patógenos y parásitos diagnosticados en plantas y animales.

Los patógenos son organismos o entes biológicos que son agentes causales de enfermedades. Los parásitos son organismos que viven a expensas de otros organismos. En plantas y animales se distinguen los siguientes tipos de patógenos y parásitos:

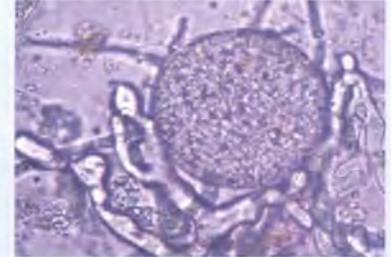
**1.1. Hongos:** son organismos eucariotas, heterótrofos, sin movimiento, pluricelulares (a excepción de las levaduras), filamentosos y sin diferenciación celular. Se distinguen desde microscópicos a gigantes (*Macrocybe titans* Pegler).

**1.1.1. Características:** al ser organismos eucariotas, el ADN se encuentra dentro del núcleo, el cual es de tipo lineal, es decir, son filamentos largos que poseen un principio y un fin. En su mayoría poseen pared celular cuyo componente principal es la quitina; raras veces celulosa u otros compuestos orgánicos complejos. Realizan digestión externa, es decir secretan enzimas para desdoblar el alimento y luego absorberlo. Carecen de clorofila. Son quimio-heterótrofos y generan ATP por medio de respiración aeróbica o por fermentación. Almacenan energía en forma de glucógeno o lípidos. Se



**Figura 1:** Germinación de una espora de *Phaeoisariopsis griseola* agente causal de la mancha angular en el frijol común.

reproducen de manera sexual por esporas (Fig. 1.) o asexual (hifas). Poseen estructuras somáticas y reproductivas muy diferenciadas entre sí, que son usadas para su clasificación taxonómica y para diagnóstico.



**Figura 2.** a) Hoja de papa con síntomas de tizón tardío, b) agente causal del tizón tardío *Phytophthora infestans* (Mont) de zBary. Fotos cortesía de la Dra. Débora Casco, laboratorio de diagnóstico de patógenos de la EAP, Zamorano.

**1.1.2. Importancia:** viven en su mayoría en el suelo, aunque su distribución es amplia, existen más de 1,500,000 especies (de las cuales 8,000 son fitopatógenas). Muchos son saprófitos, es decir, descomponen restos de organismos muertos (materia orgánica); o son parásitos y patógenos de otros organismos vivos. Son usados en fermentaciones industriales para producir alimentos, bebidas, sustancias medicinales, ácidos orgánicos, reguladores de crecimiento vegetal y otros metabolitos secundarios. Se usan como organismos de experimentación en genética, citología y bioquímica, por sus cualidades de rápido crecimiento, reproducción y manejo. Algunas especies realizan simbiosis con otros organismos como plantas (micorrizas) y algas (líquenes). También se utilizan como alimento y algunos son venenosos.

Ciertas especies se utilizan en control biológico para el control de plagas y enfermedades, ya que pueden generar trampas para protozoos y nematodos, invaden o digieren otros organismos o producen antibióticos, toxinas u otras sustancias antagonicas.

**1.2. Cromistas:** son conocidos como pseudohongos o también como hongos cromistas, existen al menos 500 especies.

**1.2.1. Características:** son organismos eucariotas, unicelulares o pluricelulares, autótrofos y heterótrofos. Poseen hifas no septadas (cenocíticos). Se reproducen de manera sexual por contacto gametangial (anteridio y oogonio) produciendo esporas denominadas ovogonias (oogonium). También se reproducen de manera asexual a través de zoosporas (esporas que se mueven por medio de un flagelo).

**1.2.2. Importancia:** son patógenos de plantas y animales; ocasionan hasta el 100% de pérdidas en los cultivos cuando no son detectados a tiempo. Entre los patógenos más importantes de plantas tenemos a *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary (Fig. 2) agente causal del tizón

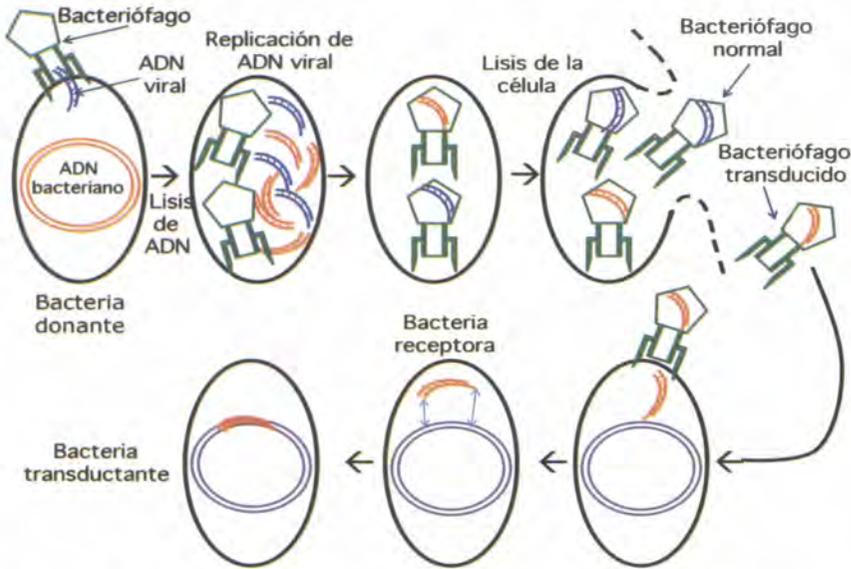


Figura 3. Transducción bacteriana por medio de virus líticos (bacteriófagos), ampliado y modificado de Pierce (2002).

por cientos de años y germinar cuando las condiciones ambientales sean favorables.

### 1.3.1.2 Reproducción sexual:

a) **Transformación**, se da, cuando una célula donante libera de manera natural al medio, un fragmento de ADN y éste es absorbido por una célula receptora, generando una nueva combinación genética.

b) **Conjugación** por medio de pilis sexuales, en la cual las bacterias intercambian material genético por medio del plásmido denominado factor F.

c) **Transducción**, un fragmento de ADN es transferido de una bacteria a otra por medio de un bacteriófago (virus que atacan bacterias). La bacteria receptora es infectada por bacteriófagos líticos, el ADN viral es introducido en la célula donante y produce lisis del nucleoide. El ADN viral se replica y produce cápsides, dentro de las cuales se pueden introducir fragmentos de ADN del bacteriófago y de la bacteria donante. Estos nuevos

bacteriófagos con ADN bacteriano y viral pueden infectar a una bacteria receptora e inyectar el fragmento de ADN, dando como resultado una célula transductante (Fig. 3).

1.3.2. **Importancia:** las bacterias se encuentran en todos los hábitats, desde condiciones normales a los extremos, como el grupo de bacterias extremófilas, que pueden vivir bajo condiciones en las que la mayoría de organismos no pueden hacerlo. Existen millones de especies, su crecimiento exponencial bajo condiciones favorables les permite poblar rápidamente un sustrato u hospedero. Las bacterias patógenas que afectan los cultivos agronómicos o a los animales de granja pueden arrasar con los mismos, si no son detectadas y controladas a tiempo, he ahí la importancia de un diagnóstico de patógenos preventivo o de corrección, para evitar pérdidas en agricultura y ganadería. Son microorganismos importantes en la formación de la materia orgánica del suelo y en la descomposición de macro y microorganismos. Algunas realizan simbiosis con otros organismos, como es el caso de los ruminantes con bacterias que habitan el rumen y ayudan a la digestión de las fibras en el alimento vegetal, o en la Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN) atmosférico, como el caso de las bacterias aeróbicas facultativas del género *Rhizobium* (Fig. 4), con plantas de la familia de las Leguminosas. Por su versatilidad de manejo, crecimiento, ácidos nucleicos no complejos, entre otras características, son usados como organismos de experimentación en genética, genómica, química y farmacología.

1.4. **Micoplasmas (Mycoplasma):** son bacterias que carecen de pared celular. Los micoplasmas poseen genomas pequeños de entre 580 a 1580 kb (kilopares de bases) y un bajo contenido de guanina y citosina, entre 18-40% de su genoma. Fueron descritos por primera vez en 1898 por Nocard y Roux, quienes aislaron el agente

tardío en papa y tomate; y *Phytophthora* spp. uno de los agentes causales del mal del talluelo.

1.3 Bacterias: son organismos procariotas, unicelulares, a veces forman asociaciones de células homogéneas, no poseen diferenciación celular. Su estructura celular y molecular es sencilla. Tienen distintas formas de nutrición.

1.3.1. Características: existen bacterias de distintas formas como: esféricas, elipsoidales, cilíndricas, espirales, con flagelos, fimbrias o pillis. Ya que las bacterias no tienen núcleo, su ADN se encuentra distribuido de manera no uniforme en el citoplasma. El genoma bacteriano se agrupa de manera sobre-enrollada (condensado), formando una estructura denominada nucleoide. El ADN es de tipo circular, es decir no tiene principio y no tiene fin. El nucleoide posee uno, dos o tres cromosomas; en la mayoría de bacterias se encuentran fragmentos de ADN circular extra-cromosomal de tamaño variable, denominados plásmidos. Los plásmidos se han convertido en herramientas útiles en biología molecular y de la ingeniería genética. El genoma bacteriano carece de intrones (regiones no codificantes de ADN).

Las bacterias, generalmente, se reproducen de manera sexual y asexual:

### 1.3.1.1 Reproducción asexual:

a) Fisión binaria es una simple división celular.

b) Gemación, ocurre por el apareamiento de una yema en la célula madre que luego crece y se separa formando una nueva célula bacteriana.

c) Producción de esporas asexuadas, conocidas como endosporas, las cuales pueden permanecer en latencia

causal de la pleuroneumonía bovina, *Mycoplasma mycoides*. Son microorganismos de la clase Mollicutes, del orden Mycoplasmatales y la familia Mycoplasmataceae, dos géneros: Mycoplasmas y Ureoplasmas y más de 60 especies descritas hasta la actualidad.

**1.4.1. Características:** los micoplasmas se caracterizan principalmente por no tener pared celular, son incapaces de sintetizar peptidoglicanos o sus precursores, por dicha razón son resistentes a los antibióticos como la penicilina y a sus análogos, a las tetraciclinas y en algunas ocasiones a la eritromicina; pero son sensibles a la degradación (lisis) por choque osmótico, detergentes, alcoholes y anticuerpos específico-complejos. Poseen una membrana plasmática, son filtrables, miden entre los 300 y 800 nm, por esta razón se les considera los microorganismos más pequeños de vida libre. Su capacidad biosintética es limitada, por lo cual requieren de hospederos especiales y medios complejos para su crecimiento. En medios de cultivo las colonias presentan una forma parecida a un huevo frito con diámetros de 0.3 a 0.6 mm, razón por la cual no se observan a simple vista. Se les define como microorganismos fastidiosos, es decir, son de lento crecimiento, requieren de factores de crecimiento y requerimientos nutricionales específicos. Son detectables de manera eficiente por pruebas específicas y de alta sensibilidad como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

**1.4.2. Importancia:** los micoplasmas han sido cultivados, aislados e identificados como patógenos para el hombre, los animales, los artrópodos y las plantas. Estos últimos son denominados fitoplasmas y son de gran importancia en la producción de hortalizas. Un ejemplo es el agente causal del Amarillamiento Letal del Cocotero (ALC), una

*Rhizobium leguminosarum* pv. *phaseoli* en medio de cultivo.



Nódulos de *Rhizobium leguminosarum* pv. *phaseoli* en simbiosis con frijol.



**Figura 4.** Simbiosis entre la bacteria *Rhizobium leguminosarum* pv. *phaseoli*, y el frijol común (*Phaseolus vulgaris*), en la Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN).

llevar a la muerte del organismo hospedero, ya que desprograman el ADN ocasionando así un desorden de la maquinaria biosintética del mismo. El tipo de ácido nucleico determina el tipo de virus; si el ácido nucleico es ADN se denominan virus, y si el ácido nucleico es ARN se denominan retrovirus porque para su replicación o multiplicación deben retrotranscribirse a ADN, esto lo logran gracias a una enzima denominada retrotranscriptasa. Los virus y retrovirus pueden tener dos ciclos: ciclo lítico y ciclo no lítico o lisogénico. Los virus líticos son los virus que causan destrucción o lisis de la célula hospedera, mientras que los lisogénicos no causan lisis.

**1.5.1. Características:** su raíz latina Virus quiere decir tóxico o venenoso. Es un patógeno o parásito obligado, ya que no puede replicarse por sí solo. Pueden infectar a todos los organismos vivos; se han descrito más de 5,000 virus. Los virus están compuestos de ácidos nucleicos y una capa proteica denominada cápside, la cual es un complejo proteico que protege el material nucleico, su segundo componente. La cápside también es importante en el proceso de infección y reconocimiento del hospedero. Algunos virus poseen una doble capa de lípidos denominada envoltura vírica. Poseen una gran variedad de formas y tamaños; algunos son helicoidales, circulares, icosaedrales y a manera de barras. Poseen distintas formas de diseminación como el viento, fluidos, herramientas contaminadas o por otros organismos a los cuales se les denomina vectores. Al ser entes compuestos de proteína y ácidos nucleicos, los antibióticos no tienen efecto alguno sobre ellos. Los retrovirus, al tener una molécula de ARN, necesitan convertirla en ADN para replicarse en el hospedero, esto lo hacen gracias a la ayuda de una enzima denominada transcriptasa reversa, la cual, basada en la información genética del ARN retrotranscribe una molécula de ADN en un proceso que es inverso al descrito por el Dogma Central de la Biología Molecular.

**1.5.2. Importancia:** muchos virus son agentes causales de enfermedades, pero hay algunos que no ocasionan daños en el genoma hospedero. Una vez infectado un hospedero, los virus ocasionan cambios estructurales y químicos en la célula, a lo que se conoce como efectos citopáticos, ya que controlan el funcionamiento del genoma del hospedero, desprogramándolo de sus funciones normales predeterminadas.



**Figura 5.** Palmas de cocotero con síntomas de Amarillamiento Letal. Foto cortesía de la Dra. María Mercedes Roca, laboratorio de diagnóstico de patógenos, EAP, Zamorano.

enfermedad que mata al cocotero y a una amplia gama de palmas; la cual ha llegado a destruir el 90% de palmas en costas de Honduras y otros países del Caribe (Fig. 5).

**1.5. Virus:** son entes biológicos que son capaces de ocasionar infecciones que pueden

Son importantes en agricultura ya que pueden llegar a ocasionar grandes pérdidas en los cultivos hortícolas; en animales de granjas son agentes causales de enfermedades como anemia infecciosa equina, cólera porcino (Fig. 6), rabia, son agentes causales de grande epidemias como la influenza, Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH), hepatitis B, entre otras enfermedades; que han ocasionado millones de muertes a nivel mundial, razón por la cual son un agente potencial (como armas biológicas) en el bioterrorismo.



**Figura 6.** Pulmón de cerdo con síntomas de cólera porcino. En la foto se indica el lugar de donde tomar la muestra para ser sometida a diagnóstico. Foto cortesía del Ing. Rogel Castillo, Unidad de Porcicultura, EAP Zamorano.

Son útiles en el estudio de la biología molecular y celular; por su sencillez se pueden usar para manipular e investigar los mecanismos de función de las células. Por ejemplo, se han podido entender mecanismos como el de la replicación, la transcripción, y la maduración del ARN, inmunología. Son usados como materiales científicos y en nanotecnología, ya que su cápside puede infectar células y romper la barrera interespecífica si se trata de generación de transgénicos ya que funcionan como vectores de ADN recombinante para la generación de células transgénicas.

**1.6. Priones:** son conocidos como los agentes causales de un grupo de patologías neurodegenerativas letales características en mamíferos, denominadas Encefalopatías Espongiformes Transmisibles (EBT). Estos entes son capaces de multiplicarse dentro de un mismo huésped causando una lesión en el cerebro a manera de esponja y pueden transmitirse de huésped a huésped con largos tiempos de incubación.

**1.6.1. Características:** Son entidades moleculares que carecen de ácidos nucleicos cuyo componente único, es una proteína. Por estas características y su capacidad de infección, el neurólogo bioquímico estadounidense Stanley Prusiner acuña el término prion (partícula infecciosa de naturaleza proteica). Se nombran de la siguiente manera: Prion Sc (PrP<sup>Sc</sup>), siendo ésta la proteína del prion de la enfermedad denominada Scrapie. Se denomina Prion Sc a la forma alterada de una proteína celular funcional PrP<sup>C</sup> (PrP celular), que es una proteína producida por un gen y que cumple una función específica, especialmente como neurotransmisor, regulador en procesos de diferenciación embrionaria u otra función proteica, y que ha perdido su función normal, pero que ha adquirido la capacidad de transformar o convertir la forma normal en patológica. La PrP<sup>C</sup> es soluble en detergentes, mientras PrP<sup>Sc</sup> forma agregados amorfos insolubles. La PrP<sup>Sc</sup> no es susceptible a la acción enzimática. PrP<sup>C</sup> es sensible a la acción de proteasas, y PrP<sup>Sc</sup>, por el contrario, sufre una proteólisis limitada generando anormalidad de la enzima. Los priones son resistentes a tratamientos inactivadores de ácidos nucleicos, como la radiación, ya que carecen de ellos. Al ser proteínas anormales resisten el calor y los desinfectantes. Una vez contraído el patógeno no hay forma de eliminarlo del organismo huésped.

**1.6.2. Importancia:** Los priones se pueden contagiar por ingestión de tejidos infectados, contacto físico con fluidos nasales o bucales o por la utilización de instrumentos contaminados. Son agentes causales de enfermedades en animales, las más conocidas son: Encefalopatía espongiforme bovina (BSE Vacas locas, Fig. 7), Scrapie (en ovejas), Encefalopatía transmisible (visones), Enfermedades crónicas de desgaste (mulas, ciervos, alces). Los humanos son susceptibles a varias enfermedades vinculadas a priones como la Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (CJD), Síndrome de Gerstmann-Straussler-Scheiner (GSS), Kuru, Insomnio fatal familiar (FFI), Síndrome de Alpers.

Las Encefalopatías Bovinas Espongiformes (Bovine spongiform encephalopathy BSE) más conocidas como el mal de las vacas locas, su nombre se define por causar agujeros en el cerebro dando la apariencia de una esponja. Puesto que se trata de una proteína y no de un virus con ácido nucleico, o de una bacteria y mucho menos de un organismo, su forma de multiplicación se denomina conversión ya que tiene la capacidad de alterar a otras proteínas, convirtiéndolas en priones. No hay manera de eliminar los priones una vez que han infectado a un organismo, la única forma de eliminarlos es con fuego directo. Ya que se trata de una proteína sin función, resiste altas temperaturas, desinfectantes e incluso radiación. Resisten la radiación ya que la radiación mata a los organismos eliminando los ácidos nucleicos y los priones son moléculas de proteína.



**Figura 7.** Vaca con síntomas de Encefalopatía Bovina Espongiforme, comúnmente denominada mal de las vacas locas (Villaencantada 2009).

## 2. Diagnóstico.

El diagnóstico es el resultado o la conclusión a la que se llega después de haber realizado un análisis metodológico basado en el método científico (observación, experimentación, conclusión). Se pueden distinguir tres tipos de diagnósticos de acuerdo a los marcadores usados para los mismos, de ahí que el diagnóstico puede ser:

## Tipos de Diagnóstico

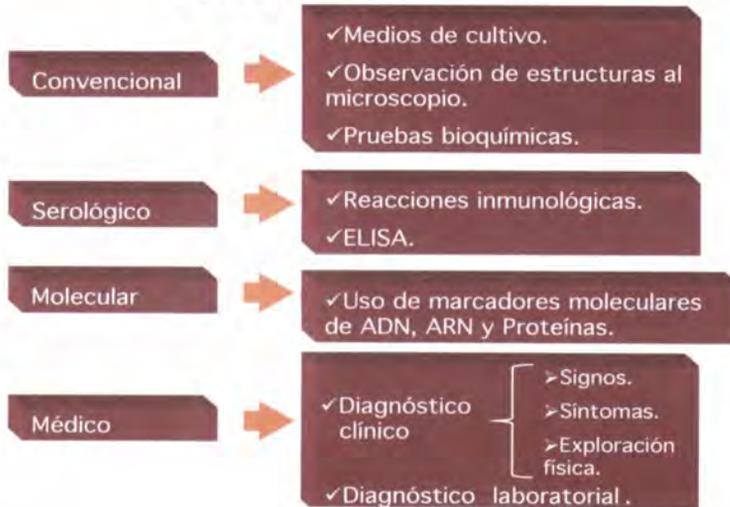


Figura 8. Tipos de diagnóstico y sus principales características.

**Diagnóstico Convencional:** basado en morfologías (marcadores morfológicos) y ciertas pruebas bioquímicas.

**Diagnóstico Serológico:** basado en reacciones de inmunidad (antígeno-anticuerpo).

**Diagnóstico Molecular:** basado en marcadores moleculares de proteínas, isoenzimas, ARN y ADN.

**Diagnóstico Médico:** se divide en dos tipos de diagnósticos, el clínico y el laboratorial. El diagnóstico clínico está basado en signos y síntomas del paciente y constituye el 90% del diagnóstico médico; mientras que el diagnóstico laboratorial implica todas las pruebas que se pueden realizar en un laboratorio con cualquier tipo de marcadores y equivale al 10% del diagnóstico médico (Fig. 8).

En medicina, por ejemplo, el diagnóstico o también denominado propedéutica es la emisión de un resultado de presencia de una enfermedad, síndrome, entidad nosológica o de algo que altere la relación salud-enfermedad, de hecho el estado de salud también es diagnosticado. El diagnóstico médico tiene dos divisiones importantes, el clínico y el laboratorial; éste segundo incluye las pruebas basadas en marcadores morfológicos, bioquímicos y moleculares.

### 2.1. Tipos de Diagnóstico

**2.1.1. Diagnóstico Convencional:** se basa en la utilización de herramientas como la observación de estructuras morfológicas al microscopio, los medios de cultivo (Fig. 9) y pruebas bioquímicas para identificar un organismo. Así por ejemplo, si se tiene una planta con necrosis poco húmeda y presencia de hifas, lo más probable es que se trate de una enfermedad fúngica. Se puede realizar un aislamiento del patógeno y cultivarlo en un medio agar-agua o en un medio selectivo para hongos.

Una vez obtenidos los aislamientos se puede usar el microscopio para identificar y caracterizar las estructuras

reproductivas de los hongos (esporas), las cuales presentan formas particulares dependiendo del género y de la especie. Una vez identificada la forma de la espora hay que volver a inocular al hospedero con el hongo aislado; si la enfermedad inicial se manifiesta, entonces el patógeno ha sido diagnosticado correctamente, a este proceso metódico se lo conoce como Postulados de Koch.

#### 2.1.1.1 Postulados de Koch:

El microorganismo debe estar presente en todos los individuos que presentan la misma enfermedad.

El microorganismo debe ser extraído del individuo enfermo y poder ser aislado en medio de cultivo artificial.

El microorganismo proveniente de ese cultivo debe causar la misma enfermedad cuando es inoculado a otro huésped sano.

El individuo infectado artificialmente debe contener el microorganismo con el que fue inoculado.

Durante el proceso se pueden hacer pruebas bioquímicas que sirven para analizar los metabolitos que son específicos para cada patógeno.

Usando este tipo de diagnóstico se pueden aislar e identificar diferentes patógenos y parásitos como los hongos, bacterias (Fig. 9) y ciertos virus, lo que permite o sirve de base para usar otras técnicas más avanzadas como la serología.

En la Fig. 9 se puede observar una manera de obtener cultivos puros a partir de un cultivo mixto usando un medio de cultivo selectivo. En el plato superior se observan dos tipos predominantes de colonias, unas semitranslúcidas y otras rosado-blancuecinas. El medio selectivo permite distinguir dos cepas de la bacteria *Escherichia coli* Mig. la cepa semitranslúcida corresponde a la cepa patógena para los seres humanos, denominada O157:H7 y las



Figura 9. Medio de cultivo selectivo SMAC (MacConkey Agar II con sorbitol) usado en el aislamiento de cepas de *Escherichia coli* Mig.

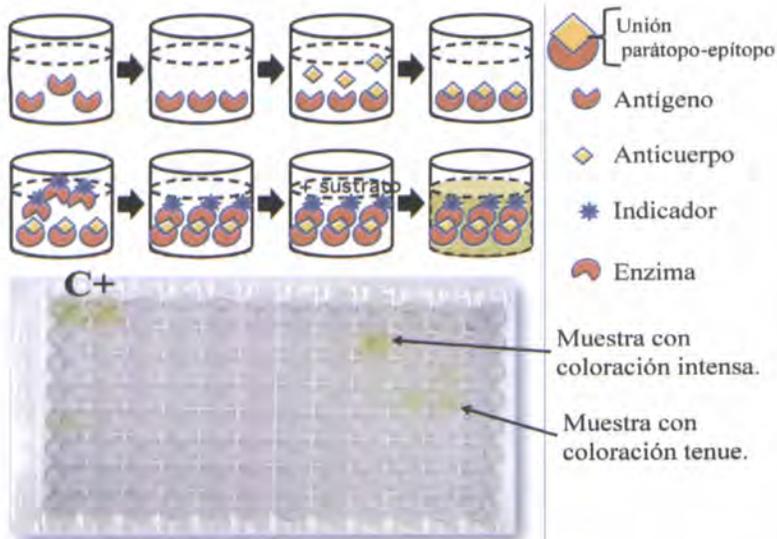


Figura 10. Técnica ELISA. C+: control positivo.

colonias rosado-blanquecinas corresponden a la cepa convencional no patógena. La digestión del sorbitol por parte de las bacterias torna el medio de colores diferentes, lo que permite su aislamiento; como se observa en los platos inferiores ya son cultivos puros, es decir fueron aislados a partir de una colonia individual.

**2.1.2. Diagnóstico Serológico:** el diagnóstico serológico tiene por objetivo identificar antígenos, usando la reacción de alta especificidad denominada reacción de antígeno-anticuerpo.

La palabra antígeno proviene de dos raíces griegas, anti  $\alpha\nu\tau\iota$  = contrario, en contra de, y genes  $\gamma\epsilon\nu\omicron\varsigma$  = generar, producir. Este diagnóstico utiliza como base, reacciones de alta especificidad como la reacción de inmunidad antígeno-anticuerpo; de esta manera si se conoce el antígeno del patógeno, se puede crear o desarrollar anticuerpos específicos que permitan identificar patógenos.

Los antígenos son proteínas o polisacáridos asociados a organismos o entes biológicos estimulan la producción de anticuerpos como respuesta inmunológica de un organismo. Los antígenos de las bacterias pueden ser partes estructurales como las membranas celulares, flagelos, fimbrias, toxinas; en los virus puede ser la cápside. El ADN y ciertos lípidos pueden ser antígenos únicamente cuando se asocian a proteínas y polisacáridos, por si mismos no pueden ser reconocidos como antígenos.

Los anticuerpos son de origen proteico, también llamadas inmunoglobulinas, son desarrollados por el sistema inmunológico de los organismos ante la presencia de antígenos. Si un patógeno infecta a un organismo, el sistema inmunológico trata de identificarlo basado en su antígeno. Si el antígeno es reconocido, el patógeno es controlado por anticuerpos específicos; en caso contrario el sistema de defensa empieza a sintetizar anticuerpos basados en la información del antígeno no reconocido. Si el sistema de defensa no logra sintetizar un anticuerpo, el

patógeno prospera en el hospedero y puede ocasionarle la enfermedad o la muerte porque no hay control de la infección.

Un ejemplo del funcionamiento de la producción de anticuerpos por parte del sistema inmunológico del ser humano, sucede cuando un individuo es infectado por un patógeno desconocido, el sistema inmunológico trata de reconocer el antígeno del patógeno basado en la información del antígeno desconocido. En cambio, cuando el sistema inmunológico ya tiene la información del antígeno de algún patógeno, el sistema inmunológico del organismo reconoce fácilmente el antígeno del patógeno en cuestión y produce anticuerpos que controlan al patógeno.

Una de las técnicas más usadas en el diagnóstico serológico es la prueba ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay), que es un ensayo inmuno-absorbente ligado a enzimas. Esta técnica está basada en la unión parátipo-epitopo (reacción antígeno-

anticuerpo), que es similar a la unión específica de una llave con su respectiva cerradura. La técnica ELISA usa un indicador, colorante, que se manifiesta únicamente cuando el anticuerpo reconoce al antígeno en estudio; ya que cuando se da la unión parátipo-epitopo (antígeno-anticuerpo), hay una enzima (por lo general son fosfatasas) que reconoce esta reacción y activa al indicador haciendo que el medio cambie de color. Si el medio cambia de color, se ha dado la unión de antígeno con el anticuerpo; en caso contrario, el anticuerpo no ha reconocido a su antígeno. Por lo general se observan diferentes tonalidades de color en el medio, esto se debe a la cantidad de antígenos presentes en la muestra, esto se puede interpretar como (Fig. 10):

A mayor intensidad del color, mayor cantidad de antígenos, es decir, mayor presencia del patógeno (infección avanzada). A menor intensidad del color, menor cantidad de antígenos, es decir, menor presencia del agente causal (infección en inicio).

Si la reacción del ELISA se lleva a cabo en laboratorio se utiliza un lector que puede estar basado en fluorescencia o en espectrofotometría. Se pueden también hacer diagnósticos ELISA en campo, con paquetes portátiles (ELISA Pocket diagnostic), fáciles de usar y de manipular. El inconveniente de usar estos accesorios es que hay que llevar varias pruebas dependiendo del patógeno que se va a diagnosticar. En la figura 11 se pueden observar ejemplos de pruebas ELISA de campo, usadas para diagnosticar transgénicos de maíz y virus en chile dulce.

En la parte izquierda de la figura 11 se distinguen claramente las bandas coloreadas superiores de los controles positivos C+ y las bandas de las pruebas que dieron positivas en la detección de transgénicos de maíz. En la parte derecha se muestra una prueba usada en chile dulce, para diagnosticar el virus del mosaico de las cucúrbitas (Cucumber Mosaic Virus, CMV) que resultó negativa ya que no se observa la banda coloreada de la prueba; mientras que la prueba para el virus del mosaico

en un área determinada. Se puede parar la infección cortando el área afectada, a esto se denomina poda sanitaria y es efectiva cuando el porcentaje de incidencia es bajo.

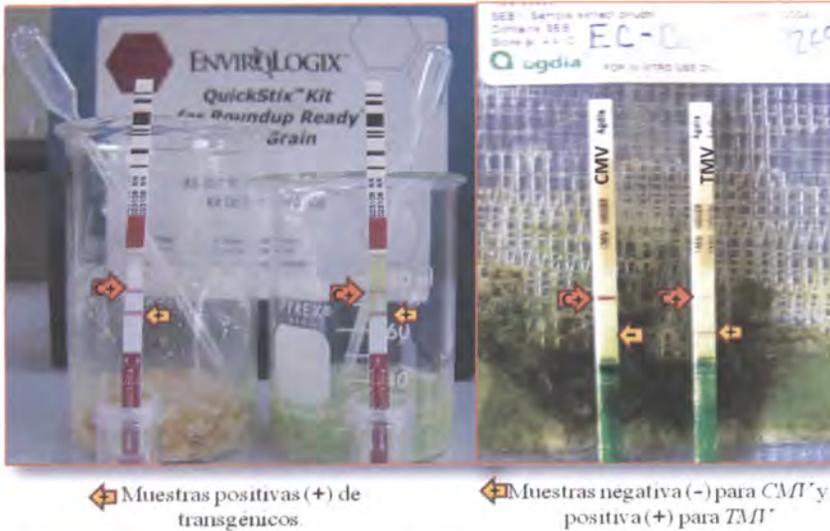
Para aislar hongos de animales se debe raspar el tejido (biopsia) ya que contrario a las plantas, es difícil extraer una muestra representativa de tejido, lo recomendado es desinfectar el área y la administración de medicamentos.

Otro de los patógenos importantes son las bacterias, que gracias a su tamaño muy pequeño, pueden infectar y desarrollarse de manera exponencial dentro de un organismo ocasionando desde serios daños hasta la muerte del mismo.

En las plantas, una vez producida la infección, las bacterias se distribuyen y crecen por todo el sistema vascular de la planta ocasionando como síntoma una marchitez generalizada. Esto se debe a que en el sistema vascular hay grandes cantidades de polisacáridos los cuales son apreciados por las bacterias, éstas consumen los polisacáridos y desechan sustancias

complejas denominadas exopolisacáridos, que son secreciones extracelulares de consistencia viscosa. Estas sustancias, sumadas a la cantidad innumerable de bacterias, ocasionan taponamiento en los haces vasculares por lo cual se dificulta el transporte de agua. La marchitez ocurre por una alta tasa de deshidratación y una baja absorción de agua. No todas las bacterias ocasionan marchitez, muchas causan pudrición. La necrosis causada por hongos es diferente de la causada por las bacterias, la cual es de tipo acuosa (Fig. 13).

Las infecciones bacterianas en animales desencadenan respuestas del sistema inmunológico tales como fiebre y síntesis de anticuerpos. Para extraer muestras de animales se debe realizar una biopsia, lo cual ocasiona estrés en el animal. Lo recomendable, observando la relación



**Figura 11.** Pruebas ELISA utilizadas para detección de transgénicos de maíz y para virus en chile dulce (*Capsicum annuum* L.). Fotos cortesía de la Dra. Débora Casco, laboratorio de diagnóstico de patógenos, EAP, Zamorano.

del tabaco (Tobacco Mosaic Virus, TMV), resultó positiva ya que se observa la banda coloreada abajo del control.

Para realizar un diagnóstico es importante seguir un procedimiento metódico de cinco pasos, basado en el método científico, que permita emitir un resultado objetivo y un diagnóstico acertado:

- Observación signos y síntomas del organismo en estudio.
- Recolección de la muestra que va a ser sometida a diagnóstico.
- Aislamiento del agente causal.
- Reconocimiento del agente causal.
- Confirmación del diagnóstico por medio de los postulados de Koch.

Si una planta presenta síntomas de infección fúngica y se quiere aislar el agente causal de la parte infectada, es importante tomar una muestra del área en donde el hongo está en constante crecimiento, es decir el umbral entre la parte sana y la necrótica. No se debe muestrear donde haya necrosis ya que se puede errar en el diagnóstico porque se pueden aislar organismos saprófitos y no el verdadero agente causal.

En la figura 12 podemos observar un ejemplo del área donde se debe hacer el corte para el aislamiento. Conforme avanzan la infección, el hongo patógeno en crecimiento va secretando enzimas para descomponer macromoléculas en partículas asimilables. La infección empieza por la germinación de una espora o de una hifa, la cual va creciendo



**Figura 12.** Muestreo de tejido para aislamiento del hongo *Rhizoctonia solani* pv. *Thanatephorus cucumeris*, estado sexual del agente causal de la enfermedad en frijol Mustia Hilachosa.

Marchitez causada por la bacteria *Ralstonia*.



Pudrición con hedor fuerte causada por *Erwinia*.



**Figura 13.** Síntomas de marchitez y pudrición causadas por bacterias.

Fotos cortesía de la Dra. Débora Casco, laboratorio de diagnóstico de patógenos, EAP, Zamorano.

biosintética del hospedero para replicar más virus. Es difícil establecer virus en medios de cultivos convencionales; no todos responden de la misma manera, razón por la cual se diagnostican virus con técnicas avanzadas como la serología y el análisis de ADN. Los virus en animales no se pueden eliminar, se genera resistencia. Los virus que atacan animales de granja, como los cerdos, pueden matar al hospedero, como es el caso del parvovirus en lechones, que se replica en las microvellosidades del intestino, ocasionando la muerte, los animales que sobreviven son desnutridos ya que no pueden asimilar nutrientes.

**2.1.3.- Diagnóstico Molecular:** este diagnóstico se basa en la búsqueda de un fragmento de ADN o ARN de interés. Para

costo beneficio, es suministrar antibióticos y desinfectar el área infectada (Fig. 14).

Los síntomas causados por los virus en plantas se manifiestan como clorosis (pérdida del pigmento verde), arrugamiento, achaparramiento y deformaciones en el follaje y en los frutos (Fig. 15). Esto se debe a que el ADN o el ARN viral penetran en el genoma del hospedero y lo desprograma, es decir las funciones predeterminadas de codificación del genoma del hospedero son obstruidas por la información genética del virus, quienes usan la maquinaria



**Figura 14.** Infección de pezón y ubre, mastitis (Handresen 2008).

llegar a emitir un diagnóstico acertado es importante seguir un conjunto de normas y procedimientos que deben estar establecidos y estandarizados en un laboratorio (Fig. 16), de acuerdo a las normas de bioseguridad. El diagnóstico molecular es el más acertado, eficiente y se apoya de los diagnósticos convencional y serológico, pero no se basa en morfologías ni en la observación de reacciones bioquímicas, sino que analiza directamente las moléculas de ADN o ARN que llevan la información genética y necesita de estas moléculas para su fin; por esa razón es importante obtenerlas de manera segura y confiable.

**Paso 1. Toma de muestra:** para el desarrollo de este diagnóstico se debe recolectar una muestra de tejido, la cual depende del objetivo del diagnóstico; si se va a diagnosticar genes o analizar el ADN genómico, se recomienda muestrear tejido joven como meristemos o primordios foliares y florales. Si el objetivo es diagnosticar un patógeno, lo importante es tomar una muestra del tejido infectado o donde se presente el síntoma de la enfermedad causada por el patógeno; por ejemplo, si hay síntomas de virus como corrugamiento o clorosis, la muestra debe ser de esa parte afectada. Cuando el tejido presenta necrosis lo recomendable es muestrear el umbral entre la parte sana y la necrótica, para de esta manera obtener más ADN o ARN del agente causal (Fig. 17).

**Paso 2. Extracción de ADN:** la extracción de la molécula a ser sometida a estudio es el segundo paso en el diagnóstico molecular. El ADN y el ARN están

a) Síntomas de virus en follaje

b) Malformaciones en frutos



BCMV

BGMV

**Figura 15.** A) Síntomas de virus en follaje y frutos. Virus del Mosaico Común del Frijol (Bean Common Mosaic Virus, BCMV). Virus del Mosaico Dorado Amarillo del Frijol (Bean Golden Yellow Mosaic Virus, BGYMV). b) Síntomas causados por potyvirus en berenjena y en tomate. Fotos cortesía de la Dra. Débora Casco, laboratorio de diagnóstico de patógenos, EAP, Zamorano.

## DIAGNÓSTICO MOLECULAR

**DIAGNÓSTICO MOLECULAR:** busca la presencia o ausencia de un fragmento de ADN o ARN de interés.

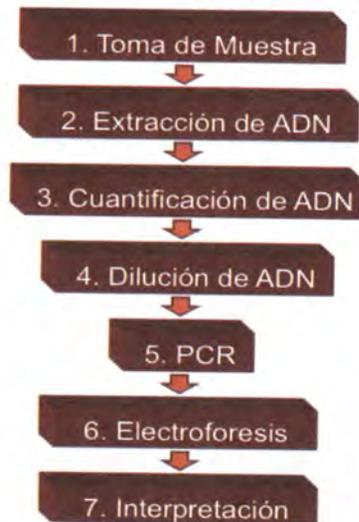


Figura 16. Proceso del diagnóstico molecular.

asociados a proteínas. En el proceso, estas proteínas son eliminadas por métodos físicos y químicos, razón por la cual durante el proceso de extracción se debe tener cuidado para no romper o dañar el ADN y el ARN.

**Paso 3. Cuantificación de ADN:** una vez extraído el ADN o el ARN se debe cuantificar el ADN o ARN para conocer la concentración inicial.

**Paso 4. Dilución del ADN:** se debe diluir las muestras de altas concentraciones de más de 100 ng/μl (dependiendo del tipo de marcador molecular a usar), de tal manera que todas las muestras al ser sometidas a diagnóstico queden estandarizadas.

**Paso 5. PCR:** una vez diluidas las muestras, se deben someter a una amplificación (hacer copias) por medio de una técnica molecular denominada PCR (Polymerase Chain Reaction), la cual multiplica o incrementa fragmentos específicos de una secuencia conocida de ADN o de ARN. El objetivo de la amplificación por PCR es tener el número suficiente de moléculas para realizar la lectura mediante una herramienta molecular denominada electroforesis.

**Paso 6. Electroforesis:** la electroforesis permite separar moléculas basadas en su carga y peso. El producto de PCR puede tomar varios caminos, como la secuenciación, electroforesis, clonación o inserción (ingeniería genética).

**Paso 7. Interpretación:** si el diagnóstico trata de encontrar un gen de interés, se debe decidir si conservar o descartar los organismos que presen-

ten o no los genes de interés. Por ejemplo, el gen de interés para la resistencia al virus del mosaico dorado amarillo del frijol (VMDAF) es el alelo recesivo del gen *bgm-1*. Si en los resultados de electroforesis, una planta analizada presenta el marcador para este gen, entonces esta planta debe ser conservada ya que presenta resistencia a dicho virus.

El mejoramiento genético es una herramienta muy usada es la Selección Asistida por Marcadores Moleculares, por medio de la cual se puede mejorar el proceso de selección de genotipos superiores.

En cambio, si el diagnóstico trata de encontrar el agente causal de una enfermedad, la presencia del marcador indicaría si se trata o no del agente causal. Por ejemplo, si una planta de frijol presenta una banda a la misma altura del control positivo, esta planta tiene la enfermedad buscada.

La realización correcta de los pasos para el diagnóstico molecular bajo normas de bioseguridad es el factor determinante para la emisión de un diagnóstico acertado. A continuación se describen los conceptos y los procesos del diagnóstico molecular.



Recolección de muestra para extracción del ADN genómico.

### Partes a muestrear para diagnóstico de patógenos en plantas.



Figura 17. Partes a muestrear para diagnóstico molecular en plantas.

## II. PRINCIPIOS DE BIOSEGURIDAD

Etimología: Bio = vida  
Securitas = seguridad

Vida segura, libre de peligro. La Bioseguridad es una ciencia que se encarga del manejo seguro de organismos vivos o parte de ellos, e implica una serie de políticas y procedimientos adaptados a reducir posibles riesgos que puedan resultar de la aplicación de la biotecnología a la agricultura. Un programa o un marco regulatorio nacional de bioseguridad, le permite a un país regular la producción y la liberación de productos transgénicos, incluyendo los organismos vivos modificados (OVMS) los cuales son capaces de reproducirse. Las regulaciones son también esenciales para facilitar la investigación y el desarrollo de cultivos transgénicos, porque las instituciones y proveedores de tecnologías no conducirán pruebas de campo con cultivos transgénicos a menos que estos hayan sido aprobados por un organismo gubernamental responsable (IICA 2008).

La bioseguridad tiene tres sectores: inocuidad de los alimentos, vida y sanidad de las plantas y de los animales.

Richmond y McKinney manifiestan que: la contención describe métodos seguros para manipular materiales infecciosos en el medio ambiente del laboratorio donde son conservados. El objetivo de la contención es reducir o eliminar la exposición de quienes trabajan en laboratorios u otras personas, y del medio ambiente externo, a agentes potencialmente peligrosos.

La contención primaria es la protección del personal y del medio ambiente inmediato del laboratorio de la exposición a agentes infecciosos. Es provista mediante buenas técnicas microbiológicas como a través del uso de equipos de seguridad adecuados. El uso de vacunas puede brindar un mayor nivel de protección del personal. La contención secundaria es la protección del medio ambiente externo al laboratorio de la exposición a materiales infecciosos, se logra a través de una combinación del diseño de la instalación y prácticas operativas. La evaluación del riesgo del trabajo a realizar con un agente específico determinará la combinación apropiada de estos tres elementos.

**1. Prácticas y técnicas de laboratorio:** Es importante el cumplimiento estricto de las prácticas y técnicas microbiológicas estándar. Las personas que trabajan con agentes infecciosos o materiales potencialmente infectados deben conocer los riesgos potenciales, y deben estar capacitadas en las prácticas y técnicas requeridas para manipular dichos materiales en forma segura. El director del laboratorio es responsable de brindar u organizar la capacitación adecuada del personal. Cada laboratorio está obligado a desarrollar o adoptar un manual de operaciones o de bioseguridad que identifique los riesgos que se encontrarán o puedan producirse, y que especifique las prácticas y procedimientos destinados a minimizar o eliminar las exposiciones a estos riesgos. Se debe alertar al personal

acerca de los riesgos especiales, y exigir que lea y cumpla las prácticas y procedimientos requeridos. Un científico capacitado y bien informado acerca de las técnicas de laboratorio adecuadas, procedimientos de seguridad y riesgos asociados a la manipulación de agentes infecciosos debe ser el responsable de la conducción de los trabajos con cualquier agente o material infeccioso. Esta persona tiene la obligación de consultar a profesionales especializados en bioseguridad u otros profesionales de la salud y seguridad respecto de la evaluación del riesgo.

Cuando las prácticas de laboratorio estándar no son suficientes para controlar los riesgos asociados a un agente o a un procedimiento de laboratorio en particular, es necesario aplicar medidas adicionales que deben ser seleccionador por el director del laboratorio.

**2. Niveles de bioseguridad (NBS):** son combinaciones de prácticas y técnicas de laboratorio, equipos de seguridad e instalaciones de laboratorio. Cada combinación es apropiada para las operaciones llevadas a cabo, las vías de transmisión documentadas o sospechadas de los agentes infecciosos, y la función o la actividad del laboratorio.

El o los NBS representan aquellas condiciones bajo las cuales el agente puede manipularse en forma segura. El director del laboratorio es responsable de evaluar los riesgos y de aplicar adecuadamente los niveles de bioseguridad recomendados. Cuando se cuenta con información específica para sugerir que la virulencia, la patogenicidad, los patrones de resistencia a antibióticos, la disponibilidad de vacunas o tratamientos, u otros factores han sido alterados significativamente, se pueden especificar prácticas más (o menos) estrictas.

**2.1. Nivel de bioseguridad 1 (NBS 1):** las prácticas, los equipos de seguridad, el diseño y la construcción de la instalación del Nivel de Bioseguridad 1 son adecuados para laboratorios destinados a la educación o capacitación secundaria o universitaria, y para otros laboratorios en los cuales se trabaja con cepas definidas y caracterizadas de microorganismos viables que no se conocen como generadores sistemáticos de enfermedades en humanos adultos sanos. El *Bacillus subtilis*, *Naegleria gruberi*, el virus de la hepatitis canina infecciosa, y los organismos exentos conformes a las Normas de ADN Recombinante, NIH (Recombinant DNA Guidelines NHI) son representativos de los microorganismos que cumplen con estos criterios. Muchos agentes no asociados con procesos de enfermedades en humanos son, patógenos oportunistas y pueden causar infección en individuos jóvenes, ancianos, inmunodeficientes o inmunodeprimidos.

**2.2. Nivel de bioseguridad 2 (NBS 2):** las prácticas, los equipos, el diseño y la construcción de instalaciones del Nivel de Bioseguridad 2 son aplicables a laboratorios educativos, de diagnóstico, clínicos o laboratorios donde se trabaja con un amplio espectro de agentes de riesgo moderado que se encuentran presentes en la comunidad y que están asociados con enfermedad humana de variada gravedad.

**2.3. Nivel de bioseguridad 3 (NBS 3):** las prácticas, equipos de seguridad y el diseño y la construcción de las instalaciones del Nivel de Bioseguridad 3 pueden aplicar-

se a instalaciones clínicas, de producción, investigación, educación o diagnóstico, donde se trabaja con agentes exóticos o indígenas con potencial de transmisión respiratoria, y que pueden provocar una infección grave y potencialmente letal.

**2.4. Nivel de bioseguridad 4 (NBS 4):** las prácticas, equipos de seguridad, y el diseño y la construcción de instalaciones del Nivel de Bioseguridad 4 son aplicables al trabajo con agentes peligrosos o tóxicos que representan un alto riesgo individual de enfermedades que ponen en peligro la vida, que pueden transmitirse a través de aerosoles y para las cuales no existen vacunas o terapias disponibles.

**3. Equipo de protección personal básico (EPP) para trabajar en el laboratorio de biotecnología aplicada de la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano.**

**1. Gabacha**

Protege el cuerpo y la ropa común de sustancias que causan daño directo  
Debe estar hecha de tela gruesa y resistente

**2. Mascarillas**

Ayudan a proteger del polvo y sustancias irritantes.  
Poseen filtro y protector desechable

**3. Lentes**

Lentes, UVEX ultraspec.  
Protegen a los ojos de los rayos UV

**4. Guantes**

Fabricados de nitrilo, marca HIGH FIVE®  
Protegen la piel de las manos de sustancias que causen daño.  
Evitan contaminación en los procesos.

**4. Práctica # 1. Regulaciones de conducta y Bioseguridad en el Laboratorio de Biotecnología Aplicada de la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano.**

Antes de realizar trabajos de investigación en el laboratorio, los estudiantes y empleados deben ser orientados a seguir las siguientes medidas para prevenir accidentes y contaminación:

La entrada al laboratorio está restringida a criterio del jefe del laboratorio, cuando el peligro del experimento sea alto.

El estudiante y el empleado deben llegar bañados en la mañana y al medio día, tener el uniforme (camisa, pantalón y zapatos) y ropa de trabajo limpios (empleados).

Todos los objetos ajenos al laboratorio como bolsos, cuadernos o abrigos, deben ser colocados en el lugar asignado dentro del laboratorio, toda área de trabajo en el laboratorio debe permanecer libre de artículos no útiles.

Cada estudiante y empleado es responsable de la vestimenta, EPP y materiales asignados durante su estadía en el laboratorio.

Todas las personas se deben lavar las manos con abundante agua y jabón desinfectante, luego ponerse la ropa de trabajo y el EPP.

Usar la ropa y materiales adecuados para el tipo de trabajo asignado en el laboratorio. Siempre se debe usar guantes de protección térmica al momento de manipular cristalería, instrumentos o contenedores calientes.

Está prohibido el uso y/o manipulación de equipo del laboratorio o sus partes sin la autorización del instructor y la supervisión del personal del laboratorio. Está terminantemente prohibido jugar con los instrumentos o reactivos, probarlos o extraerlos del laboratorio.

No se permite consumir alimentos dentro del laboratorio.

Todos los desechos deberán ser depositados en sus respectivos contenedores.

Mantener el orden y limpieza en el área de trabajo. En caso de derrame accidental de alguna sustancia tóxica o cancerígena notificar inmediatamente al instructor o persona encargada.

No tocarse la boca y ojos cuando está manipulando reactivos en el laboratorio.

Lavarse las manos muy bien después de haber finalizado cualquier trabajo dentro del laboratorio, usando jabón y desinfectante.

Al final del día todo el laboratorio debe quedar en completo orden y limpieza.



## 5. Práctica # 2. Lista de chequeo de Seguridad.

Nombre de la actividad realizada:

---

---

Nombre y código del estudiante:

---

---

Fecha: \_\_\_\_\_ Tiempo de duración de la practica (horas) \_\_\_\_\_

No.	Actividad Realizada	Sí	No	Acción Tomada
1	¿Conoce las regulaciones para trabajar en el Laboratorio?			
2	¿Conoce todo el EPP que necesita para trabajar en las diferentes áreas del laboratorio?			
3	¿Tiene disponible todo el EPP obligatorio y en buen estado?			
4	¿Existe un botiquín de primeros auxilios con todos los implementos en óptimas condiciones?			
5	¿Ha recibido una charla previa de cómo utilizar los equipos que tiene el laboratorio?			
6	¿Conoce los riesgos potenciales de cada área de trabajo del laboratorio?			
7	¿El instructor realizó una demostración previa a la práctica?			

Con la firma de este documento Usted certifica que ha leído todas las reglas descritas en el manual y se compromete a cumplirlas.

OBSERVACIONES:

---

---

---

---

---

FIRMA DEL SUPERVISOR:

---



## III.- El ADN

### Objetivos específicos:

- Conocer la estructura, organización y funcionalidad del ADN en la célula.
- Aprender los pasos principales de la extracción de ADN genómico para someterlo a diagnóstico molecular.
- Desarrollar destrezas y habilidades en el manejo de instrumentos y la manipulación de reactivos dentro del laboratorio.
- Aplicar los conceptos aprendidos para el manejo y procesamiento de las muestras sometidas a diagnóstico molecular, bajo normas de Bioseguridad.
- Aprender a extraer ADN genómico para someterlo a diagnóstico molecular.

### 1. Introducción

El ácido desoxirribonucleico, comúnmente denominado ADN o DNA (por sus siglas en inglés Desoxirribonucleic Acid) es una macromolécula que se encuentra superenrollada y asociada con proteínas en el núcleo de las células eucariotas o en el citoplasma de las células procariotas. Esta molécula contiene la información genética, la cual es extraída durante el desarrollo de un organismo.

El ADN puede describirse como la molécula de la vida. Sus funciones principales pueden resumirse en: 1) es el material hereditario universal; 2) por su capacidad de autoduplicación, acarrea toda la información genética que es transmitida de una generación a otra y hace posible la diversidad; y 3) mediante su composición genética, basada en un código simple de cuatro nucleótidos y más la interacción con el medio ambiente, es capaz de dirigir la síntesis de proteínas que definen la morfología y fisiología de los organismos.

Las dos primeras funciones están íntimamente relacionadas. El intercambio de ADN entre organismos es común y resulta en individuos con características transmitidas por sus padres mediante la herencia, y a la vez con una nueva combinación de características únicas, generando biodiversidad y promoviendo la evolución. Las plantas y los animales transfieren el ADN a través del sexo (considerado uno de los motores de la evolución), entre miembros de una misma especie. Las bacterias lo hacen a través de procesos como la conjugación, y los virus para su replicación usan la maquinaria biosintética de las células hospedadoras en plantas, animales y bacterias.

Durante el ciclo celular, el ADN se duplica o replica, antes de que la célula se divida, para obtener así, dos células idénticas por medio de un proceso llamado mitosis, otro proceso de división celular que reduce a la mitad el número de cromosomas es la meiosis. Los organismos eucariotas como las plantas, los animales y los hongos almacenan la mayoría de su ADN lineal o terminal dentro del núcleo celular, a lo que se denomina ADN interfásico y una mínima parte en organelos, como en las mitocondrias, en los plastos y en los centros organizadores de microtúbulos o centriolos. Los organismos procariotas como las bacterias y los arqueas, almacenan el ADN circular en el citoplasma de la célula. Los virus que

contienen ADN en su estructura y lo guardan en el interior de una estructura proteica denominada cápside.

A partir de la definición de la estructura del ácido desoxirribonucleico (ADN), (Watson y Crick 1953), y durante los últimos 20 años, la calidad, diversidad y magnitud de los avances en las ciencias biológicas han sido dramáticas. El desarrollo de técnicas para la duplicación sintética del ADN ha permitido el estudio minucioso de esta molécula y del genoma de los organismos y antes biológicos como los virus. Ello ha resultado en un mayor conocimiento y entendimiento de la función de los genes y de los mecanismos que gobiernan su expresión. Este descubrimiento ha hecho posible la ingeniería genética como la conocemos en la actualidad, desde la duplicación completa de organismos a partir de células individuales, hasta el desarrollo de nuevos genomas mediante la introducción de genes. El impacto de estos avances no se limita a laboratorios ni a publicaciones científicas, sino que forman parte de la vida diaria de cada individuo, por ejemplo en forma de cultivos genéticamente modificados o transgénicos en la alimentación.

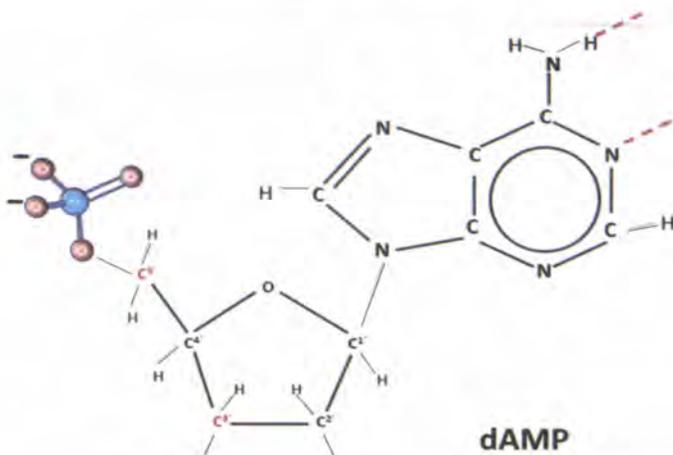
### 2. Propiedades físicas y químicas

El ADN está organizado en estructuras complejas denominadas cromosomas y está formado por la unión de nucleótidos opuestos que se complementan. Los organismos vivos no poseen ADN como una molécula individual, sino como una pareja de moléculas estrechamente asociadas (homólogos). El ADN bicatenario se enrolla sobre sí mismo y sobre un eje vertical formando una especie de escalera de caracol, denominada doble hélice y a lo que se conoce como arrollamiento plectonómico. La doble cadena de ADN mide de 2.2 a 2.6 nm de ancho, y un nucleótido mide 0.33 nm de largo. Aunque cada monómero individual que se repite es muy pequeño, los polímeros de ADN pueden llegar a ser moléculas muy grandes con millones de nucleótidos (pares de bases). Así tenemos el cromosoma humano más largo que es el cromosoma número 1 y que mide aproximadamente 220 millones de pares de bases.

El modelo de la estructura en doble hélice fue propuesto en 1953 por James Watson y Francis Crick en su artículo Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Desoxyribose Nucleic Acid. Este modelo tiene una alta importancia que radica en su consistencia con las propiedades físicas y químicas del ADN. El modelo muestra también la complementariedad de bases lo que hace relevante su función en el proceso de replicación o duplicación basado en la secuencia de bases donde se almacena la información genética.

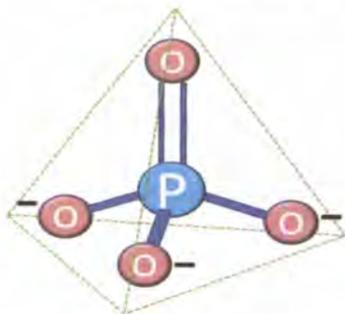
### 3. Estructura del ADN

La unidad estructural del ADN es el nucleótido (Fig. 18), el cual está formado por la unión de un grupo fosfato, un azúcar y una base nitrogenada. Cada nucleótido que se repite contiene un segmento de la estructura de soporte (azúcar + fosfato), lo que mantiene a la cadena unida, y la base nitrogenada que interacciona con la cadena complementaria de ADN. La base nitrogenada ligada a un desoxirribosa se denomina nucleósido, mientras que una base nitrogenada ligada a un azúcar y a uno o más grupos fosfatos reciben el nombre de nucleótido. Cuando varios



**Figura 18.** Estructura del nucleótido monofosfato, desoxi Adenosin MonoFosfato (AMF) o de sus siglas en inglés des Adenosine MonoPhosphate (dAMP).

nucleótidos se encuentran unidos entre sí, el polímero resultante se denomina polinucleótido. Los grupos fosfatos poseen un oxígeno con un enlace disponible lo que le da la carga negativa a la molécula.

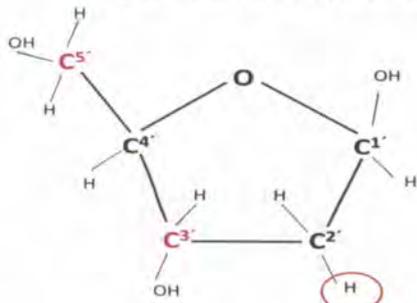


**Ión fosfato**

**Figura 19.** Estructura en forma de tetraedro del ión fosfato.

El ión fosfato ( $PO_4^{3-}$ ) (Fig. 19) se deriva del ácido ortofosfórico  $H_3PO_4$ , el cual en su estructura química posee un átomo de fósforo en el centro unido a cuatro oxígenos, de los cuales uno está saturado y tres insaturados. A los oxígenos insaturados se unen: el primero por medio de enlace fosfodiéster al carbono cinco prima  $C5'$  del azúcar del nucleótido del cual forma parte, el

segundo se satura cuando forma parte de la cadena de ADN y se une al carbono tres prima  $C3'$  del azúcar del nucleótido superior, y el tercero se une a nucleoproteínas para mantener la estructura estable de la molécula de



**β-D-2-Desoxiribosa**

**Figura 20.** Beta, Dextro, dos, Desoxiribosa, Azúcar componente del ADN.

El azúcar del ADN es la β-D-2-Desoxiribosa ( $C_5H_{10}O_4$ ) (Fig. 20). Es una pentosa que se deriva de la ribosa. Este azúcar se caracteriza por carecer de un oxígeno en el carbono dos prima  $C2'$ . La β-D-2-desoxiribosa se une al fosfato con su carbono cinco prima  $C5'$  para formar el nucleótido y en la formación de la cadena de ADN el carbono tres prima  $C3'$  se une a un

oxígeno del grupo fosfato de un nucleótido subsiguiente. Al carbono uno prima  $C1'$  se une una de las bases nitrogenadas, ya sean purinas o pirimidinas.

Las bases nitrogenadas que forman parte en la estructura del ADN son compuestos aromáticos heterocíclicos con dos o más átomos de nitrógeno. Se distinguen dos tipos de bases nitrogenadas: las Púricas o Purinas (Fig. 21), formadas por dos anillos unidos entre sí, y las Pirimidicas o Pirimidinas (Fig. 22) que se derivan de la pirimidina y que poseen un solo anillo en su estructura. Formando el ADN hay cuatro pares de bases: Adenina, Guanina (purinas), Citosina y Timina (pirimidinas). En el ARN la Timina es reemplazada por el Uracilo (pirimidina).

La 6-aminopurina, posee un grupo amino en el carbono seis prima  $C6'$ . En el código genético se representa con la letra A, su fórmula química es  $C_5H_5N_5$  y se une a la base nitrogenada Timina por medio de

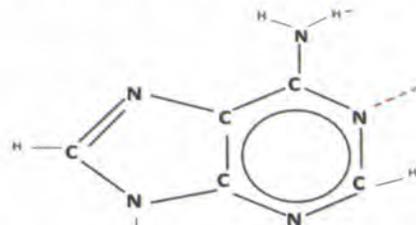
dos puentes de hidrógeno.

La 6-oxo, 2-amino-purina o Guanina (purina), posee un grupo oxo en el carbono seis prima  $C6'$ , y un grupo amino en el carbono dos prima  $C2'$ . Se representa con la letra G en el código genético, su fórmula química es  $C_5H_5N_5O$  y se une a la Citosina con tres puentes de hidrógeno (Fig. 21).

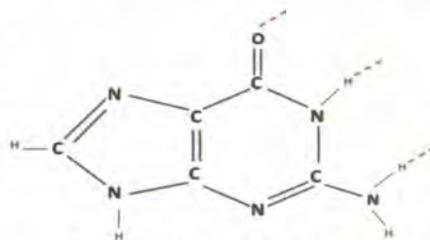
La 2, 4-dioxo, 5-metilpirimidina o Timina (pirimidina), posee dos grupos oxo y un grupo metil en la posición 5'. En el código genético se representa con la letra T, su fórmula química es  $C_5H_8N_2O_2$ , esta base siempre se une con la Adenina por medio de dos puentes de hidrógeno.

La 2-oxo, 4 aminopirimidina o Citosina (pirimidina), posee un oxígeno en la posición dos y un grupo amino en el carbono cuatro. Se representa con la letra C en el código genético, su fórmula química es  $C_4H_5N_3O$  y se une a la Guanina con tres puentes de hidrógeno (Fig. 22).

La 2,4-dihidroxipirimidina o Uracilo, de fórmula  $C_4H_4N_2O_2$ , forma parte del ARN y se representa con la letra U en el código genético. Reemplaza a la Timina cuando el ADN se transcribe en ARN. Otras bases derivadas de la Adenina son la Hipoxantina y la Cafeína que son abundantes en el ARNt (ARN de transferencia).



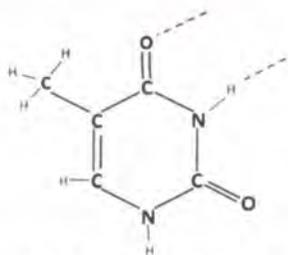
**6- amino purina o Adenina (A)**



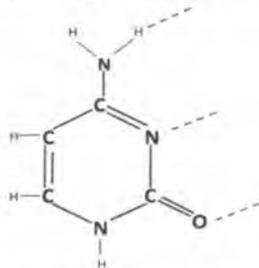
**6-oxo, 2-aminopurina o Guanina (G)**

**Figura 21.** Bases púricas.

# Biotecnología Aplicada



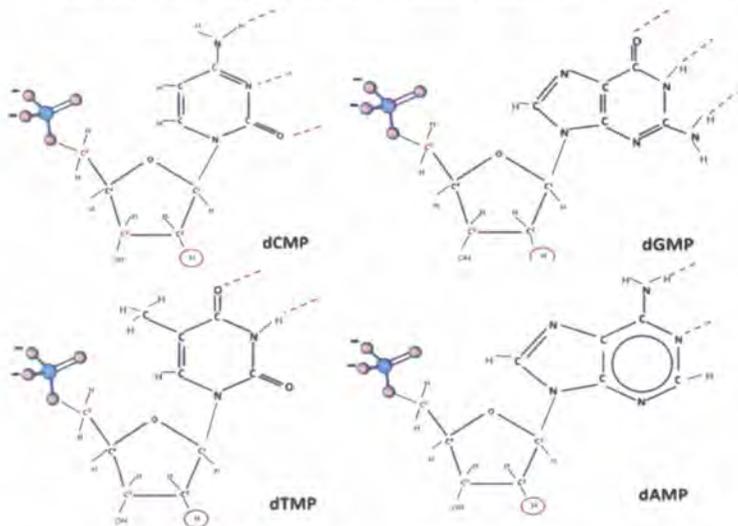
**2, 4-dioxo, 5-metil pirimidina o Timina (T)**



**2-oxo, 4-aminopirimidina o Citosina (C)**

**Figura 22. Bases pirimidicas**

desoxi Timina monosfosfato (dTMP) o desoxy Thymidine MonoPhosphate (dTMP), desoxi Adenosin monosfosfato (dAMP) o desxy Adenosine MonoPhosphate y desoxi Guanosin monosfosfato (dGMP) o desoxi Guanosine



**Figura 23. Desoxinucleótidos monosfosatos, componentes estructurales del ADN.**

MonoPhosphate (dGMP).

Químicamente, el ADN es un polímero de nucleótidos (polinucleótido), los nucleótidos se organizan en dos cadenas antiparalelas (paralelas en sentidos opuestos) dispuestas en una estructura de doble hélice. Las cadenas se unen por medio de puentes de hidrógeno de acuerdo a la complementariedad de sus bases nitrogenadas. La

El Aciclovir es una base nitrogenada que se deriva del Uracilo y son usados en terapias antivirales y antitumorales.

Con las cuatro bases nitrogenadas se pueden formar cuatro nucleótidos, los cuales forman parte de la estructura del ADN (Fig. 23): desoxi Citosina MonoFosfato (dCMP) o por sus siglas en inglés desoxy Cytidine MonoPhosphate (dCMP).

característica estructural más importante del ADN, esencial para todas sus funciones biológicas, es el apareamiento específico entre sus cuatro bases complementarias: Adenina se une con Timina y Guanina se une con Citosina a cada unión entre dos nucleótidos complementarios se le conoce como pares de bases y ésta es la unidad de medida del ADN (Fig. 24). El grupo azúcar-fosfato se ubica de forma externa a lo largo de la molécula, y las bases nitrogenadas lo hacen hacia el interior de la molécula (Fig. 25).

Las implicaciones de la estructura de ADN incluyen las siguientes: 1) el código lineal hace posible convertir la secuencia de nucleótidos de ADN en secuencias de aminoácidos y posteriormente en proteínas; 2) mediante el apareo complementario de bases, la molécula puede autoduplicarse; y 3) debido a la fineza de su estructura, pueden existir mutaciones genéticas debido al intercambio de bases.

## 4. Estructura tridimensional del ADN

Asociadas al ADN se encuentran muchos tipos de proteínas, como por ejemplo las histonas y los factores de transcripción, que se unen al ADN otorgándole una estructura tridimensional determinada y regulando así la expresión genética. Los factores de transcripción reconocen las secuencias reguladoras del ADN y determinan específicamente la pauta de transcripción de los genes. Todo el material genético de una célula (dotación cromosómica) se denomina genoma y puede tener

pequeñas variaciones entre cada especie, cada genoma es característico y único para cada individuo. El ADN posee cuatro estructuras las cuales se describen a continuación:

### 4.1. Estructura primaria

Se refiere al armazón básico (Fig. 25) de la cadena de ADN, las dos cadenas de polinucleótidos organizadas de manera antiparalela (paralelas pero en sentidos opuestos), las cuales se unen por medio de puentes de hidrógeno de acuerdo a la ley de la complementariedad de bases. Guanina se une a Citosina con tres puentes de hidrógeno y Timina se une con Adenina se unen con dos puentes de hidrógeno. Esta estructura posee la secuencia de bases nitrogenadas que llevan la información genética. El interior de la cadena es hidrofóbica y la parte exterior de la cadena es hidrofílica, haciendo del ADN una molécula anfipática.

### 4.2. Estructura secundaria

Es la estructura de doble hélice postulada por Watson y Crick (1953), la cual se origina por la fuerza de repulsión de las cargas negativas de los extremos de la cadena (grupos fosfato), las cadenas se enrollan sobre un eje imaginario originando lo que se denomina arrollamiento plectonómico. La cadena de ADN puede girar hacia la izquierda o hacia la derecha generando ADN levógiro o dextrógiro, respectivamente. Esta estructura permitió explicar el almacenamiento de la información genética y los mecanismos de la duplicación.

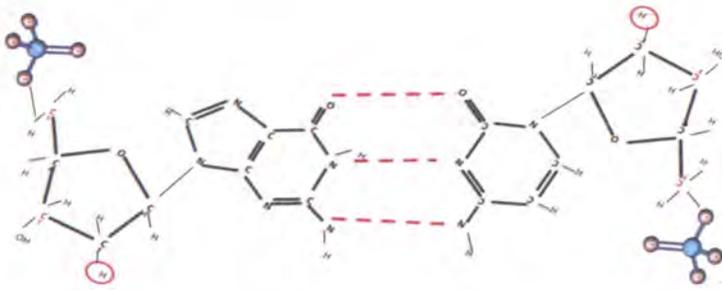


Figura 24. Complementariedad de bases: apareamiento de pares de bases por medio de puentes de hidrógeno

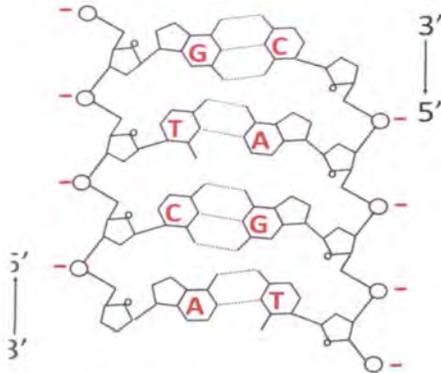


Figura 25. Estructura básica de la molécula de ADN

Los ángulos formados entre las uniones de las desoxirribosas de cada cadena generan dos tipos de hendiduras alrededor de la superficie de la doble hélice. Distinguiéndose así: la hendidura o surco mayor de 2.2 nm de ancho, y la hendidura o surco menor de 1.2 nm de ancho. El giro completo de 360° desde el inicio de la hendidura mayor hasta el final de la hendidura menor mide 3.4 nm, y cada vuelta posee 10.5 pares de base.

En la conformación más común que adopta el ADN, la doble hélice es dextrógira, girando cada par de bases respecto al anterior unos 36°. En el ADN helicoidal al girar, ya sea a la derecha o a la izquierda, se forman depresiones o hendiduras entre una cadena y la otra, de tal manera que quedan expuestos los lados de las bases nitrogenadas del interior (Fig. 26).

La abertura de la hendidura mayor hace que los extremos de las bases sean más accesibles, de tal forma que hay más cantidad de grupos químicos expuestos, lo cual facilita la diferenciación entre las pares de bases C-G, G-C,

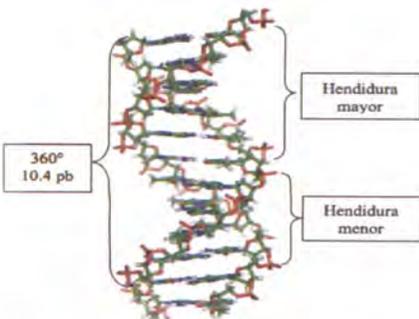


Figura 26. ADN en estructura helicoidal. Se distinguen las hendiduras mayor y menor. Imagen modificada de Wheeler (2007).

## Biotecnología Aplicada

A-T, T-A. También se ve facilitado el reconocimiento de secuencias de ADN por parte de diferentes proteínas y enzimas, sin la necesidad de abrir la doble hélice. Por ejemplo, los factores de transcripción pueden unirse a secuencias específicas, las cuales frecuentemente contactan con las laterales de las bases expuestas en la hendidura mayor. En la hendidura menor los grupos químicos expuestos son similares, de tal forma que el reconocimiento de las pares de bases se hace más difícil, esto sugiere que la hendidura mayor contiene más información accesible que la hendidura menor. Se han determinado tres conformaciones del ADN en doble hélice: ADN-A, ADN-B y ADN-Z (Fig. 27).

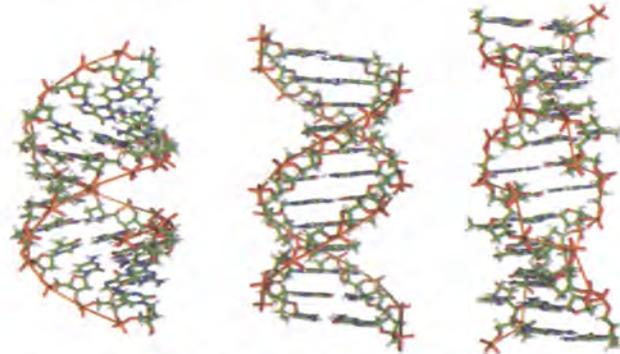


Figura 27. Tres tipos de ADN helicoidal, ADN-A, ADN-B y ADN-Z. (Wheeler 2007)

El ADN-A tiene una orientación dextrógira, es la forma deshidratada, esto ocasiona un ensanchamiento de la molécula ya que posee una hendidura menor superficial y una hendidura mayor más estrecha y profunda. Los planos de las bases están ligeramente oblicuos al eje longitudinal y 11 pares de bases dan una vuelta completa. También se puede encontrar en la célula cuando se producen apareamientos híbridos entre ADN-ARN, ARNt-ARNr o en complejos de ADN-Enzima.

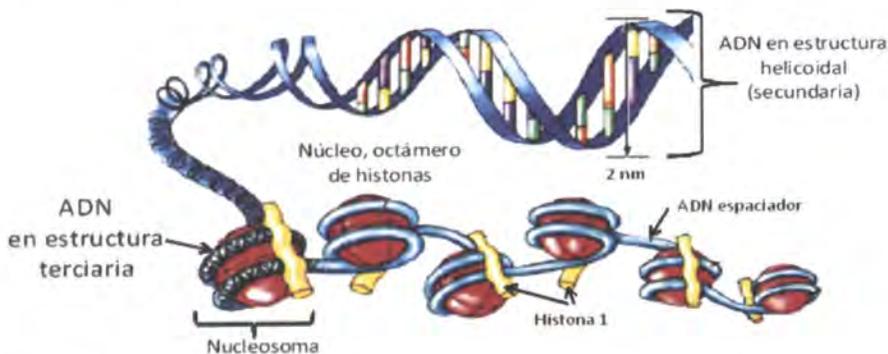
El ADN-B es la forma más conocida de ADN, la más común en la célula. Es la estructura descrita por Watson y Crick (1953), con un arrollamiento plectonómico equilibrado que muestra claramente las hendiduras mayor y menor. Los grupos ortofosfóricos se muestran siempre a la periferia haciendo a la molécula más hidrofílica hacia afuera y hacia adentro ocultan la unión de las bases nitrogenadas que por su naturaleza química son hidrofóbicas.

El ADN-Z se presenta cuando la información se ha expresado o porque no se va a expresar. Las bases nitrogenadas han sufrido modificaciones por procesos de metilación y la cadena es levógira. Este tipo de ADN permite el reconocimiento de ciertas enzimas asociadas a la regulación de la transcripción de la información genética.

## 4.3. Estructura terciaria

El ADN de las bacterias en ocasiones adopta una disposición espacial sin la intervención de las histonas, esto se llama ADN superenrollado, y se da por las tensiones que surgen cuando se varía en el número de vueltas de doble hélice. El ADN circular se asocia a proteínas plegándose como una superhélice, esto ocurre también en las mitocondrias y en los cloroplastos de los eucariotas.

En los organismos eucariotas la gran cantidad de ADN hace que el nivel de empaquetamiento sea más complejo y compacto (Fig. 28). Para lograr este empaquetamiento es necesaria la intervención de un gran complejo proteico dinámico y funcional que permita el acceso a la información genética. El ADN de estructura secundaria se une a un octámero de histonas (nucleoproteínas) formando un complejo denominado Nucleosoma.



**Figura 28.** ADN eucariótico en estructura terciaria, asociados a un octámero de histonas. Tomado y modificado de Purves *et al.* (2003).

**4.3.1. Cromatina:** La estructura compleja compuesta de ADN y proteínas localizados en un compartimento especializado (núcleo), se denomina cromatina (de la raíz griega khroma = coloreado, y soma = cuerpo). Hipotéticamente, dentro del núcleo que va de 0.5  $\mu\text{m}$  a 25  $\mu\text{m}$  o incluso centímetros de diámetro, podemos encontrar dos y más metros de ADN y esto nos da una idea del enorme grado de compactación. El ADN compactado debe ser accesible muy rápidamente para permitir su interacción con las maquinarias proteicas que regulan las funciones de la cromatina como son: la replicación, la reparación y la recombinación. La organización dinámica de la cromatina tiene una gran influencia sobre todas las demás funciones del genoma.

El **nucleosoma** es la unidad fundamental de la cromatina y está compuesto de ADN más un complejo de histonas. Es la base del primer nivel de compactación del ADN dentro del núcleo. Los nucleosomas se encuentran separados de manera casi regular a lo largo del genoma formando el nucleofilamento que puede adoptar niveles superiores de compactación, y cuando se da el máximo nivel de compactación se obtiene el cromosoma metafásico. En interfase, la cromatina se organiza en territorios denominados funcionales. Hay dos tipos de cromatina: Eucromatina y Heterocromatina.

**4.3.2. La eucromatina** altera su nivel de compactación o condensación constantemente, lo que permite el acceso a la información genética. Se encuentra físicamente localizada hacia el interior del nucleoplasma.

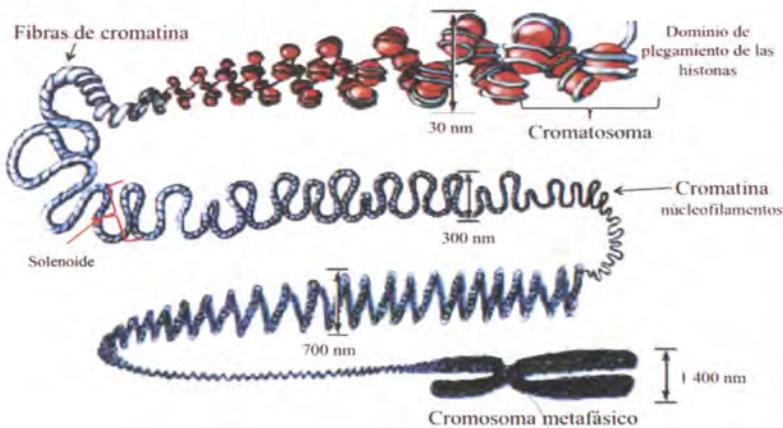
**4.3.3. La heterocromatina** es la estructura que no altera su nivel de condensación durante el ciclo celular y contrario a la eucromatina, ésta se encuentra a la periferia del núcleo. Se pueden distinguir dos tipos de heterocromatina:

**4.3.3.1. Heterocromatina constitutiva:** es altamente polimórfica, está compuesta por un tipo de ADN denominado satélite, localizado en grandes regiones coincidentes con centrómeros y telómeros, posee secuencias repetidas en tándem y se conocen principalmente los ADN satélite alfa, I, II y III. La heterocromatina constitutiva es muy estable y carece en su mayoría de información genética activa, pero se pueden encontrar pocos genes.

**4.3.3.2. Heterocromatina facultativa:** no es muy polimórfica, está compuesta por poco ADN satélite y muestra la presencia del corpúsculo de Barr (masas compactas de cromatina sexual). Posee información sobre genes que no se expresan o que pueden expresarse en algún momento que la célula lo necesite, hay también regiones transcripcionalmente activas que pueden adoptar las características estructurales y funcionales de la heterocromatina, como por ejemplo el cromosoma X inactivo de mamíferos. La heterocromatina facultativa es reversible es decir que su estado heterocromático está en función de la etapa del desarrollo de la célula.

**4.3.4. El nucleosoma:** cuando se ha digerido o fraccionado de manera parcial al ADN que forma parte de la cromatina, se obtienen fragmentos que miden entre 180 y 200 pares de base de longitud, los que se observan en los resultados en una electroforesis. Esta regularidad en la estructura de la cromatina fue confirmada mediante microscopía electrónica, en donde se distinguía una serie de partículas separadas de manera regular a manera de collar de perlas y los análisis de masas mostraron una estequiometría ADN-histonas de 1/1. El nucleosoma como la unidad fundamental de la cromatina está compuesto de una parte central o núcleo (core) y una región de unión o región internucleosomal que une las partículas core adyacentes (Fig.29).

**4.3.4.1. El núcleo** es una estructura proteica muy conservada entre distintas especies y está compuesto de un segmento de ADN de 146 pares de bases enrollado 1.7 veces alrededor de un octámero de nucleoproteínas, las cuales están formadas por dos homólogos de cada una, denominadas histonas: H3, H4, H2A y H2B. Las histonas del core son proteínas pequeñas y básicas muy conservadas en la evolución. La región más conservada de estas nucleoproteínas es su dominio central, el cual está compuesto estructuralmente de un dominio de plegamiento formado por tres hélices alfa y separadas por dos regiones lazo. Los extremos o colas aminoterminales de



nes histona/ADN e histona/histona a través del dominio de plegamiento de las histonas forman una configuración parecida a un apretón de manos. Cuando los nucleosomas se unen para formar el dominio de plegamiento, de las histonas, por la intervención de la Histona uno (H1) forman el cromatosoma.

#### 4.4. Estructura cuaternaria

Se refiere al nivel máximo de empaquetamiento del ADN asociado a proteínas denominado cromatina. La cromatina en el núcleo tiene un grosor aproximado de 300 nm. Las fibras de cromatina de 30 nm se empaquetan formando las fibras de cromatina de 300 nm. El enrollamiento que sufre el conjunto de nucleosomas recibe el nombre de solenoide. Los solenoides se enrollan formando la cromatina del núcleo interfásico de la célula eucariota. Cuando la célula entra en división, el ADN se compacta más, formando los cromosomas, siendo esta

**Figura 29.** Elementos del nucleosomas y del cromatosoma. Tomado y modificado de Purves *et al.* (2003).

estas proteínas son más variables y con pocas estructuras en común. Las colas están ricas en lisina y arginina, otorgándoles características extremadamente básicas. En esta región se dan numerosas modificaciones post-traduccionales que modificarían la carga de la histona, alterando así la accesibilidad al ADN y las interacciones proteína/proteína con el nucleosoma.

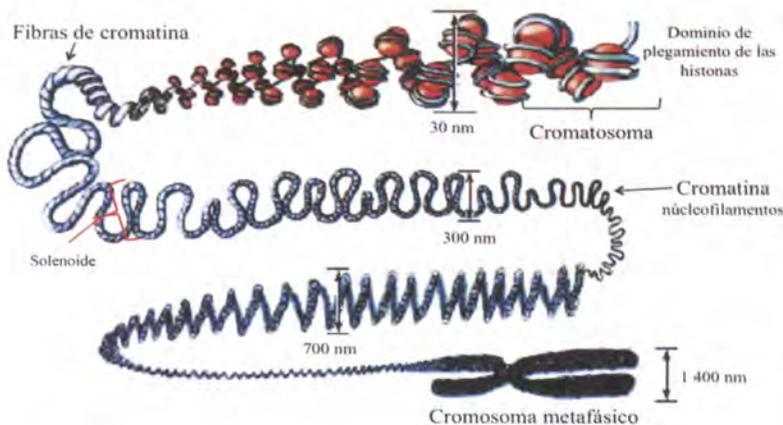
forma el nivel máximo de compactación denominado Cromosoma Metafásico (Fig. 30).

#### 4.5. Estructura en cuádruplex

Es la estructura típica de los telómeros (Fig. 31) y en donde existe gran número de repeticiones en tándem (ricas en guanina), en esta estructura el ADN es monocatenario que al irse enrollando forma una estructura cuadrangular, de ahí su nombre.

##### 4.5.1. Los telómeros

Los cromosomas lineales en sus regiones terminales poseen ADN en estructura cuádruplex, que se conocen como telómeros. Los telómeros son complejos de ADN y proteínas que están presentes en los cromosomas de los organismos procariontes. Estas regiones tienen la función de proteger los extremos de los cromosomas y la replicación de las zonas terminales de los mismos, previenen que sistemas enzimáticos como el sistema de reparación del ADN lo procesen como si fuera ADN dañado y son elementos clave para la estabilidad genómica, esto se logra gracias a un tipo de enzimas especializadas denominadas telomerasas. Las telomerasas son transcriptasas reversas de ribonucleoproteínas celulares. Las telomerasas replican los extremos 3' de los cromosomas que las ADN polimerasas no lo hacen (sintetizan

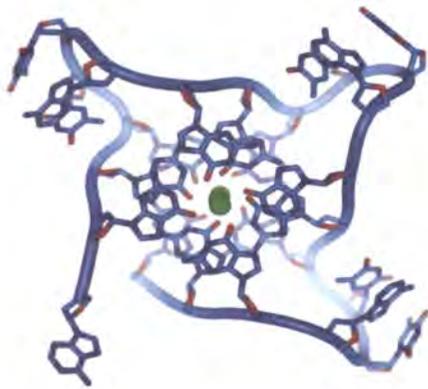


**Figura 30.** ADN en estructura cuaternaria. Tomado y modificado de Purves *et al.* (2003).

La longitud de la región de unión puede variar entre las especies e incluso el tipo celular, también se unen diversas nucleoproteínas conocidas como histonas de unión. Esto hace que la longitud total de ADN en el nucleosoma varíe entre 160 y 241 pares de bases entre las especies. Estudios realizados sugieren en primer lugar, la distorsión del ADN enrollado alrededor del octámero de histonas y en segundo lugar, las interaccio-

ADN telomérico), empezando del extremo 5' al 3' hacia el extremo distal del cromosoma. En los seres humanos los telómeros son largos, monocatenarios y con miles de repeticiones de secuencia única (TTAGGG).

Estas secuencias, ricas en guanina (G), se estabilizan mediante la formación de estructuras de cuatro nucleóti-



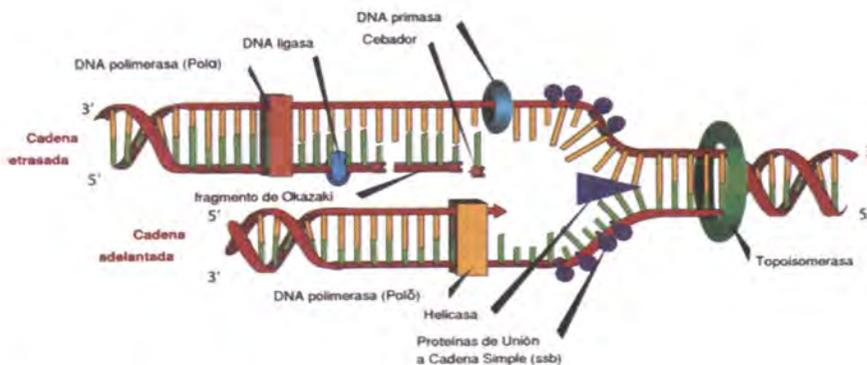
**Figura 31.** ADN en estructura cuádruplex, estructura de los telómeros. Spletstoesser (2007).

dos, estas cuatro bases forman una unidad de superficie plana las cuales se ubican una sobre otra y de esta manera forman la estructura en cuádruplex-G que es estable. Estas estructuras logran la estabilidad mediante puentes de hidrógeno entre los extremos de las bases y por medio de la quelatación de

un metal iónico ubicado en el centro de cada unidad de los cuatro nucleótidos. Estas largas cadenas a manera de lazo se denominan lazos teloméricos (T-loops), estos lazos se enroscan sobre sí mismos y a su vez con proteínas.

## 5. Duplicación del ADN

La habilidad de los organismos biológicos para reproducirse es la característica que define la vida. En su nivel más elemental, la reproducción de los organismos vivos depende de la extraordinaria y única capacidad de las moléculas de ADN para dirigir su autoduplicación de una forma ordenada y genera como resultado copias idénticas a la molécula original.



**Figura 32.** Duplicación del ADN *in vivo*. LadyoHats (2008).

La definición de la estructura de doble hélice del ADN sugirió un mecanismo para su autoduplicación, en la que una cadena parental podría servir de patrón o template para la síntesis de una cadena hija. Aunque esta propuesta de duplicación semiconservativa fue rápidamente confirmada, se requirieron muchos años para esclarecer completamente los detalles de este complejo proceso.

Durante la duplicación del ADN, la molécula original se divide en sus dos cadenas parentales que sirven como template para la síntesis de su complemento. Las bases en las cadenas parentales especifican el nucleótido que será incorporado a las cadenas en formación por medio del apareamiento complementario de bases y es un requerimiento estricto impuesto por la estructura del ADN. Para ello, se asume que existen nucleótidos provenientes de un reservorio presente en las células, y que un iniciador de polimerización es sintetizado por enzimas específicas. El ligamiento de cada nucleótido a las cadenas en crecimiento es catalizado por el complejo enzimático de la ADN polimerasa. El crecimiento de una nueva cadena replicada de ADN comienza en regiones especiales llamadas orígenes de repetición, y siempre ocurre mediante la adición de nuevos nucleótidos en la dirección de crecimiento 5' a 3' (Fig. 32).

La duplicación del ADN se origina en sitios definidos de la molécula y procede de forma bidireccional, creando dos tenedores de duplicación que se mueven en direcciones opuestas. Debido a los problemas impuestos por la orientación antiparalela de las cadenas de ADN y la polaridad de su elongación, el mecanismo de síntesis es diferente para las dos cadenas. La cadena principal se extiende de forma continua en la misma dirección del tenedor de duplicación. La segunda cadena, que se elonga en dirección opuesta, es sintetizada de forma discontinua en una serie de piezas pequeñas denominadas fragmentos de Okazaki que son eventualmente ligados.

## 6. Dogma Central de la Biología Molecular

El dogma central de la biología molecular implica el origen, flujo y almacenamiento sistemático de la información genética en los organismos vivos. Se basa en la explicación de cómo una secuencia de un hilo de ADN corresponde a la secuencia de aminoácidos de una proteína. Según este concepto, la información en el ADN es transcrita al ARN (ácido nucleico de una sola cadena y con uracilo en vez de timina) y de aquí traducida en proteínas. Esto puede parecer un gasto innecesario de energía al pasar por un paso intermedio (ARN) en lugar de una traducción directa de la secuencia de bases de un gen; existen varias razones que lo justifican: 1) el ADN puede conservarse puro y protegido en el núcleo, sin exponerse a los compuestos químicos del citoplasma; 2) la información de los genes puede ser amplificada teniendo varias copias de ARN hechas a partir de una sola copia de ADN; 3) la

regulación de la expresión de genes puede ser controlada específicamente en cada elemento involucrado en el proceso entre ADN y proteínas. Entre más elementos existan en este proceso, más oportunidades habrán para controlarlos bajo diferentes circunstancias. Existen diferentes tipos de ARN con funciones específicas: