

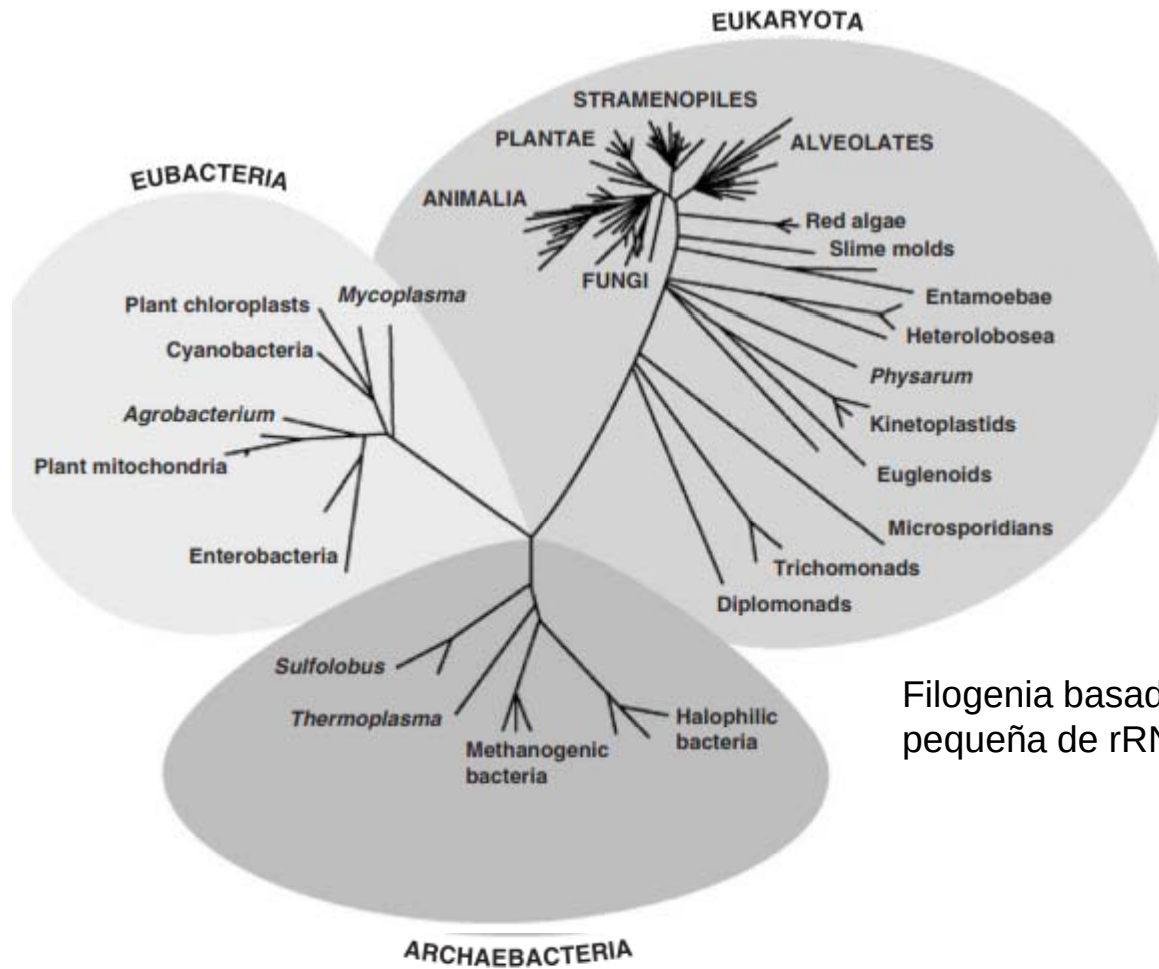
Ingeniería Genética II

Unidad II

Diversidad biológica y Citogenética

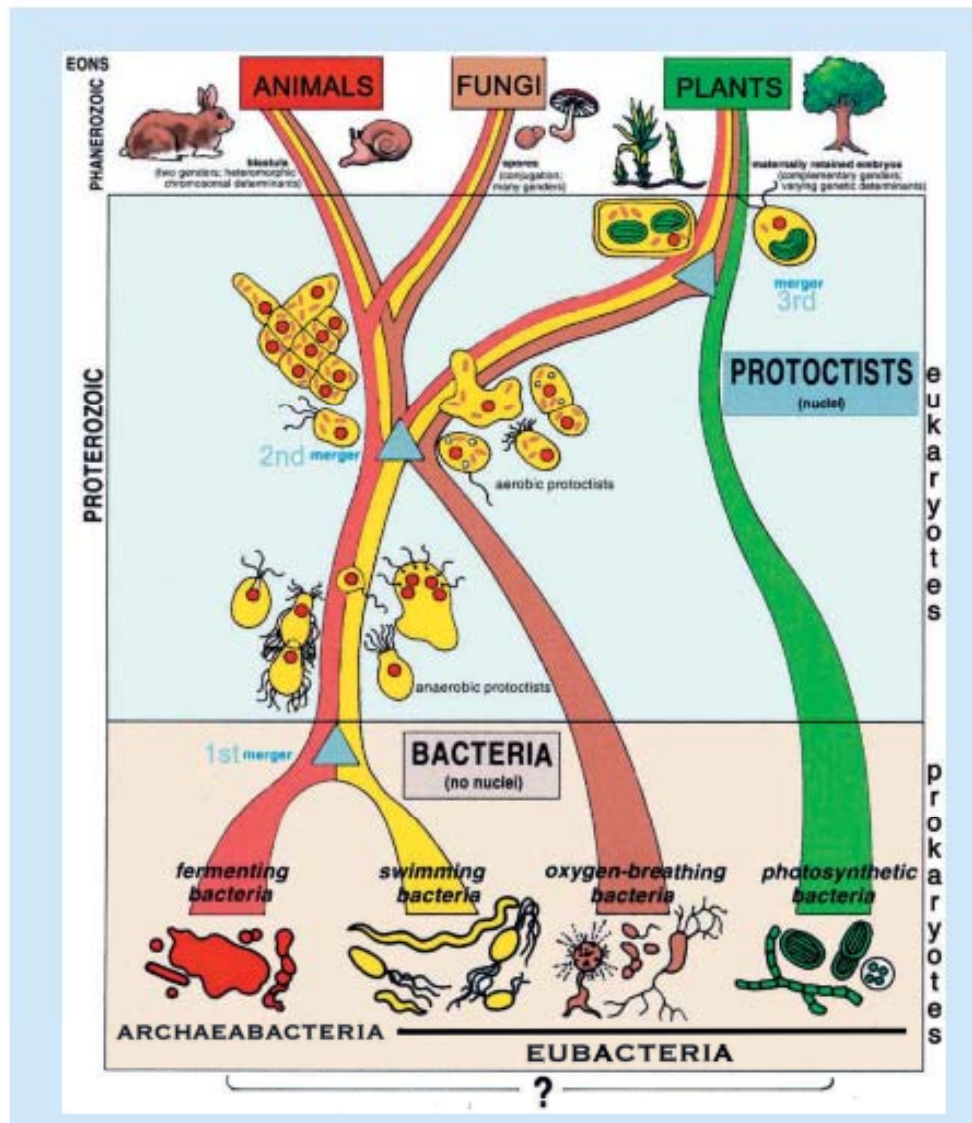
***¿Cuál es la diversidad de materia
viva que habita el planeta?***

Biodiversidad



Filogenia basada en la subunidad pequeña de rRNA

Biodiversidad



La mínima unidad de la vida: la célula

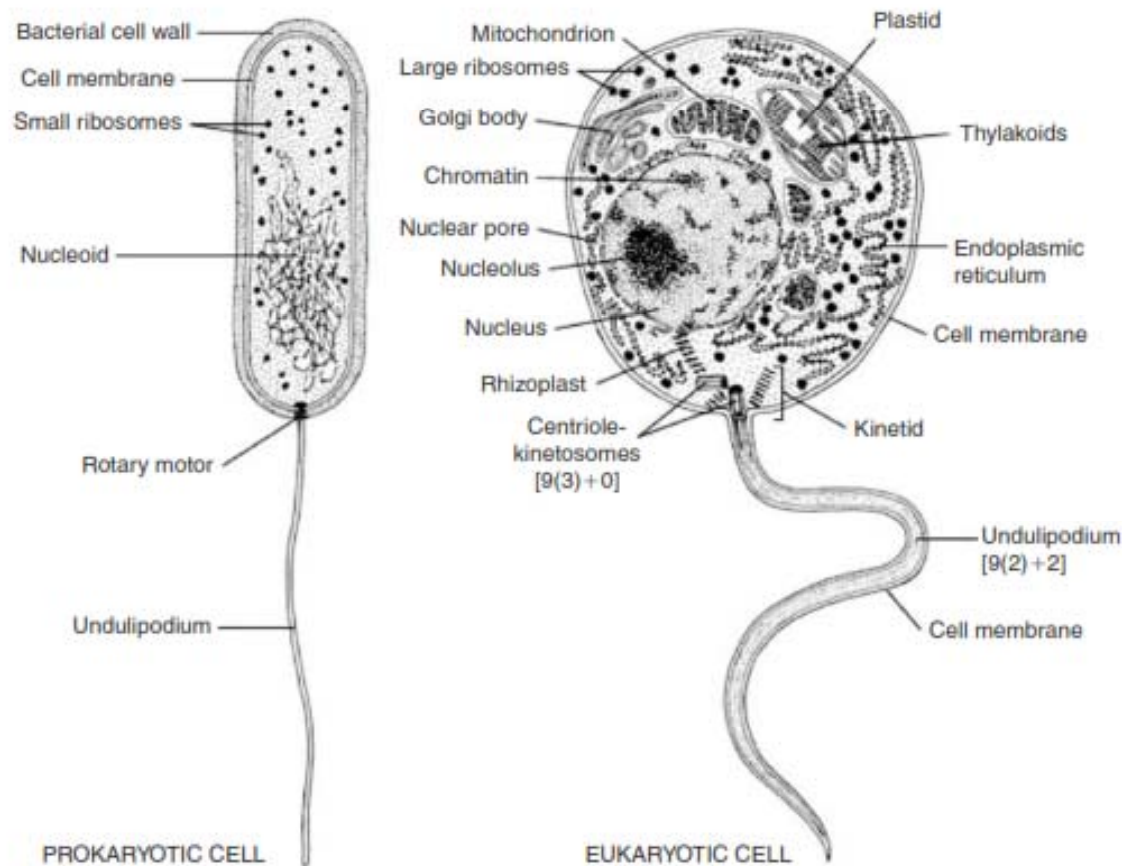


Table I-2 Comparisons of Prokaryotes and Eukaryotes

Prokaryotes	Eukaryotes
DNA (the genophore [*]) seen in electron micrographs as nucleoid (not membrane bounded). Genophores, plasmids, not chromosomes. DNA not coated with protein. Evolved by duplication and mutation of DNA.	Membrane-bounded nucleus containing chromosomes made of DNA and proteins. Evolved by duplication and mutation of DNA and by symbiogenesis; permanent associations between at least two different kinds of prokaryotes.
Cell division direct, by binary or multiple fission or budding. Centriole-kinetosomes, mitotic spindle, microtubules lacking. In sexual recombination, genetic material (as plasmid, virus, genophore, or other replicon) is transferred from donor to recipient. Reversible transfer of genes (DNA) without any cytoplasmic fusion.	Cell division by various forms of mitosis; formation of mitotic spindles (or at least some arrangement of microtubules). Sexual systems in which two partners (often male and female) participate in fertilization. Alternation of diploid and haploid forms by fertilization and meiosis. Reversible formation of hybrid (fused) nuclei (karyogamy) at fertilization by mating. Gamontogamy, [†] syngamy, [‡] conjugation, etc. usually including cytoplasmic fusion, called cytogamy.
All lack tissue development. Strict anaerobes (which are killed by oxygen), facultative anaerobes, microaerophiles, aerotolerant, and aerobic organisms. Highly diverse modes of metabolism: vary in sources of energy (light, organic or inorganic molecules), sources of electrons (organic or inorganic molecules), and sources of carbon (organic or CO, CO ₂ , CH ₄).	Some have extensive development of tissues and organs. Almost all are aerobes, needing oxygen to live; exceptions are either archaeoprotists (Phylum Pr-1) or organisms evolved from aerobes. Same metabolic patterns of oxidation within the group (Embden-Meyerhof glucose metabolism, Krebs-cycle oxidations, cytochrome-electron transport chains). They are either organoheterochemotrophs [§] (most) or photolithoautotrophs [¶] (most plants and algae). Complex [9(2)+2] undulipodia composed of tubulin and hundreds of other proteins (Figure I-3). organisms or colonial.
Bacterial flagella, composed of flagellin protein. Flagella rotate.	Enzymes for oxidation of three-carbon organic acids are packaged in mitochondria [except for archaeoprotists (Phylum Pr-1)].
Mitochondria absent; cofactors and enzymes for oxidation of organic molecules, if present, are bound to cell membranes (not packaged separately). In photosynthetic species, enzymes for photosynthesis are bound as chromatophores to cell membranes, not packaged separately. Various patterns of anaerobic and aerobic photosynthesis, including the formation of end products such as sulfur, sulfate, and oxygen.	In photosynthetic species, enzymes for photosynthesis are packaged in membrane-bounded plastids. All photosynthesizers produce oxygen.

^{*}"Bacterial chromosome," a term used by molecular biologists to refer to the genophore, is confusing and its use should be avoided.

[†]Gamontogamy: in protoctists, such as foraminiferans, fusion of two or more gamonts (reproducing cells or organisms) followed by gametogamy (fusion of gametes). Examples: Copulation, conjugation.

[‡]Syngamy: process by which two haploid cells fuse to form a diploid zygote; fertilization.

[§]Organoheterochemotroph: refers to metabolic mode in which organism uses organic compounds (from other organisms, living or dead) as sources of energy, carbon, and electrons (for example, *Escherichia coli*).

[¶]Photolithoautotroph: refers to metabolic mode in which organism uses light as a source of energy and uses inorganic compounds (such as CO₂ and H₂S) as sources of carbon and electrons (for example, *Chlorobium*).

Table I-3 Taxonomic Summary*

Nonsymbiogenetic origin Superkingdom PROKARYA (PROKARYOTAE)

Nonnucleated (prokaryotic) cells. Chromosomal genetic organization ultrastructurally visible as nucleoids. Cell-to-cell transfer of genophores, that is, of the chromoneme (large replicons) and of plasmids (and other small replicons). Ether- (isoprenoid-derivative) or ester-linked membrane lipids, without steroids, cytoplasmic fusion absent. Flagellar rotary motor motility. Concept of ploidy inapplicable. Photo-, chemosynthetic, vast diversity of metabolic modes.

Kingdom BACTERIA (PROKARYOTAE, PROCARYOTAE, MONERA)

Bacterial cell organization.

DOMAIN ARCHAEA

Methanogens, thermoacidophiles, halophiles, and probably some Gram-positive bacteria.

DOMAIN EUBACTERIA

Gram-negative and most other bacteria. Variable metabolic modes. Two surrounding lipoprotein membranes define the periplasmic space.

Symbiogenetic origin Superkingdom EUKARYA (EUKARYOTAE)

Nucleated (eukaryotic) cells, all evolved from integrated bacterial symbioses. Membrane-bounded hereditary organelles. Chromosomal genetic organization. Intracellular, microfilament- and microtubule-based motility (actin, myosin, tubulin-dynein-kinesin). Microtubule organizing centers. Whole-cell and nuclear fusion (karyogamy). Flexible steroid-containing (for example, cholesterol, cycloartenol, and ergosterol) membranes. Meiosis and fertilization cycles underlie Mendelian genetic systems.

Levels of ploidy vary.

Kingdom PROTOCTISTA (Hogg, 1880)

Mitotic organisms capable of internal cell motility (that is, cyclosis, phagocytosis, pinocytosis). Many motile by undulipodia. Binary or multiple fusion. Meiosis and fertilization cycles absent or details unique to phylum. Photoautotrophs, ingestive and absorptive heterotrophs.

Kingdom ANIMALIA

Embryo called a blastula (diploid) formed after fertilization of egg by sperm (fusion of haploid anisogametes—karyogamic cells that differ in size). Females deliver mitochondria to the zygote in cytogamy. Meiosis produces gametes. Diploids. Most are ingestive heterotrophs; some are absorptive heterotrophs.

Kingdom FUNGI

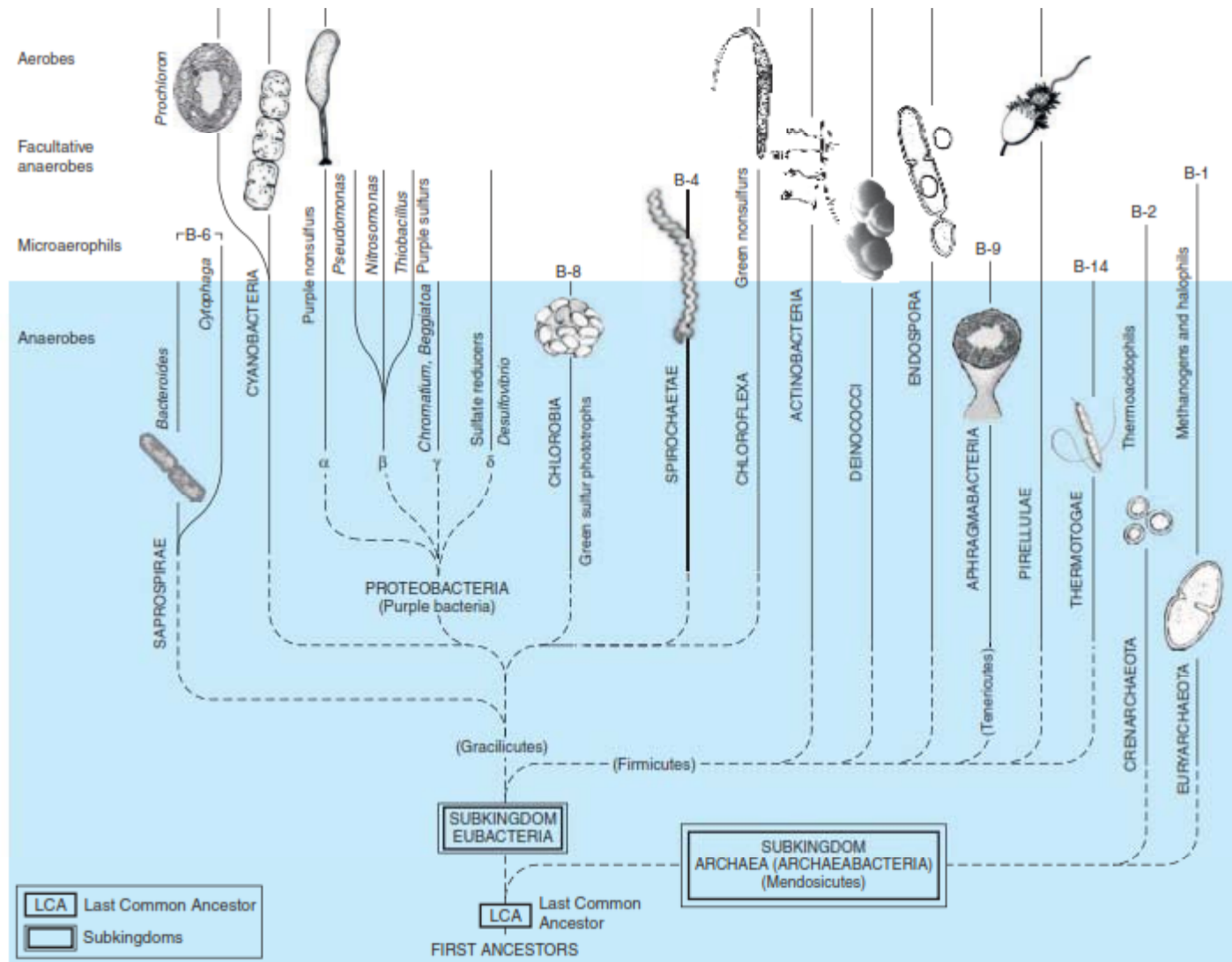
Hyphal or cell fusion. Zygotic meiosis to form resistant propagules (spores). Lack undulipodia at all stages. Haploids. Absorptive heterotrophs.

Kingdom PLANTAE

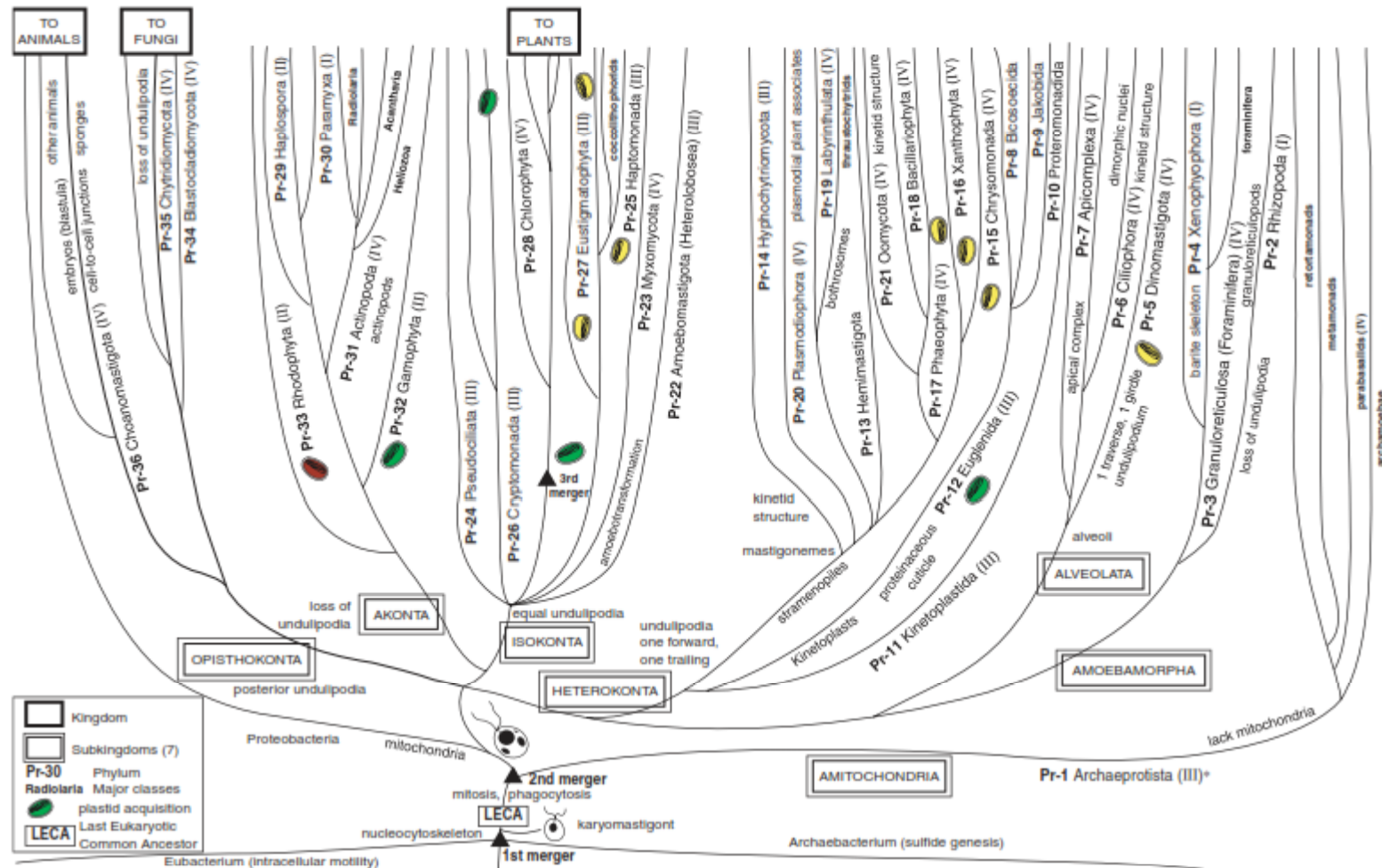
Maternally retained diploid embryo formed from fusion of mitotically produced gamete nuclei. Sporogenic meiosis produces male (antheridium; sperm-producing haploid plant organ) or female (archegonium; egg-producing haploid plant organ). Gametes formed in antheridium and archegonium and fertilized in archegonium. Alternating generations of haploid and diploid organisms. Most are oxygenic photoautotrophs.

*For the major higher taxa: Prokarya (Archaeobacteria, Eubacteria); Eukarya (Protoctista, Fungi, Animalia, and Plantae), brief technical descriptions accompany the introduction of each of their sections.

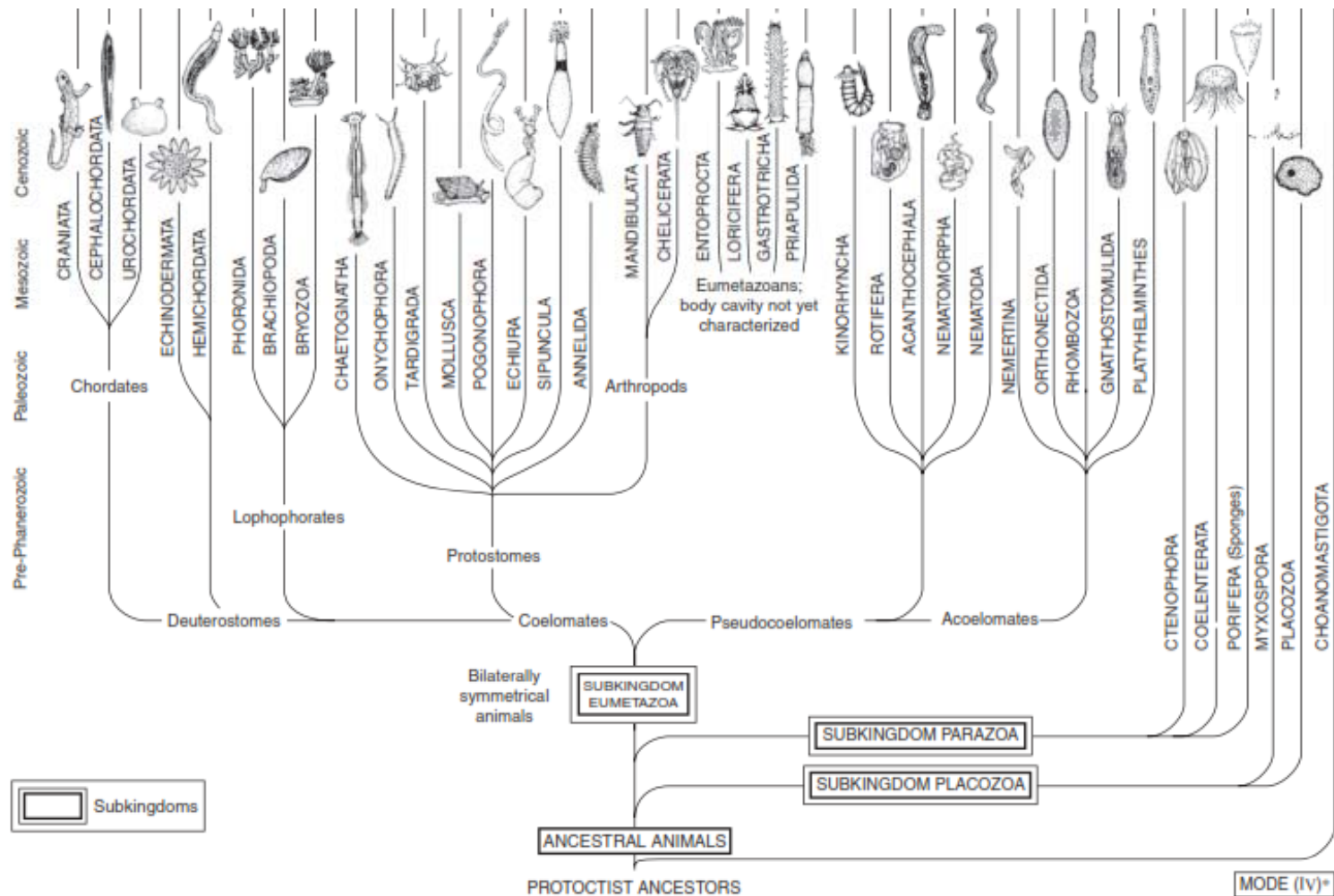
Procariotas



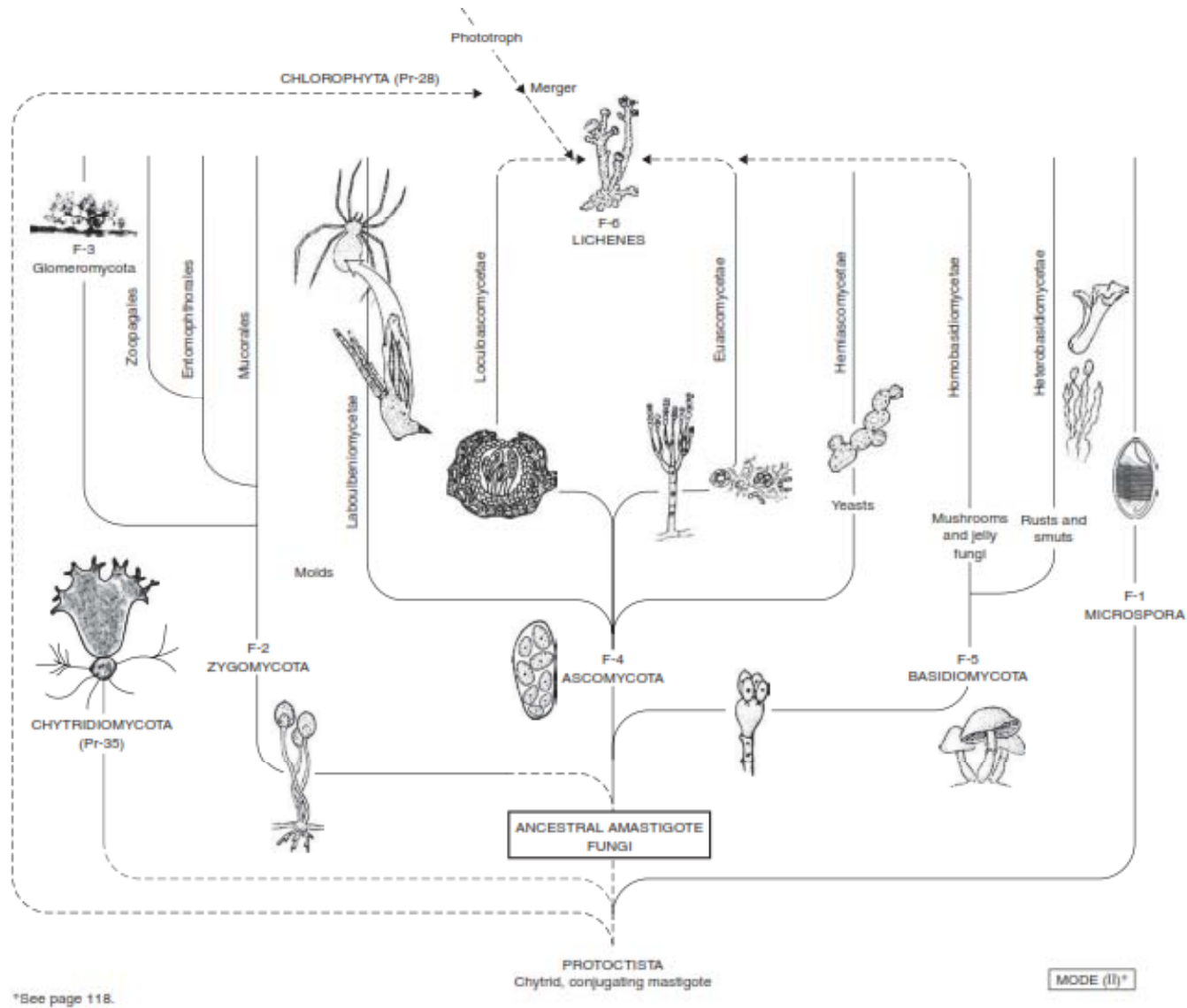
Eucariotas: Protistas



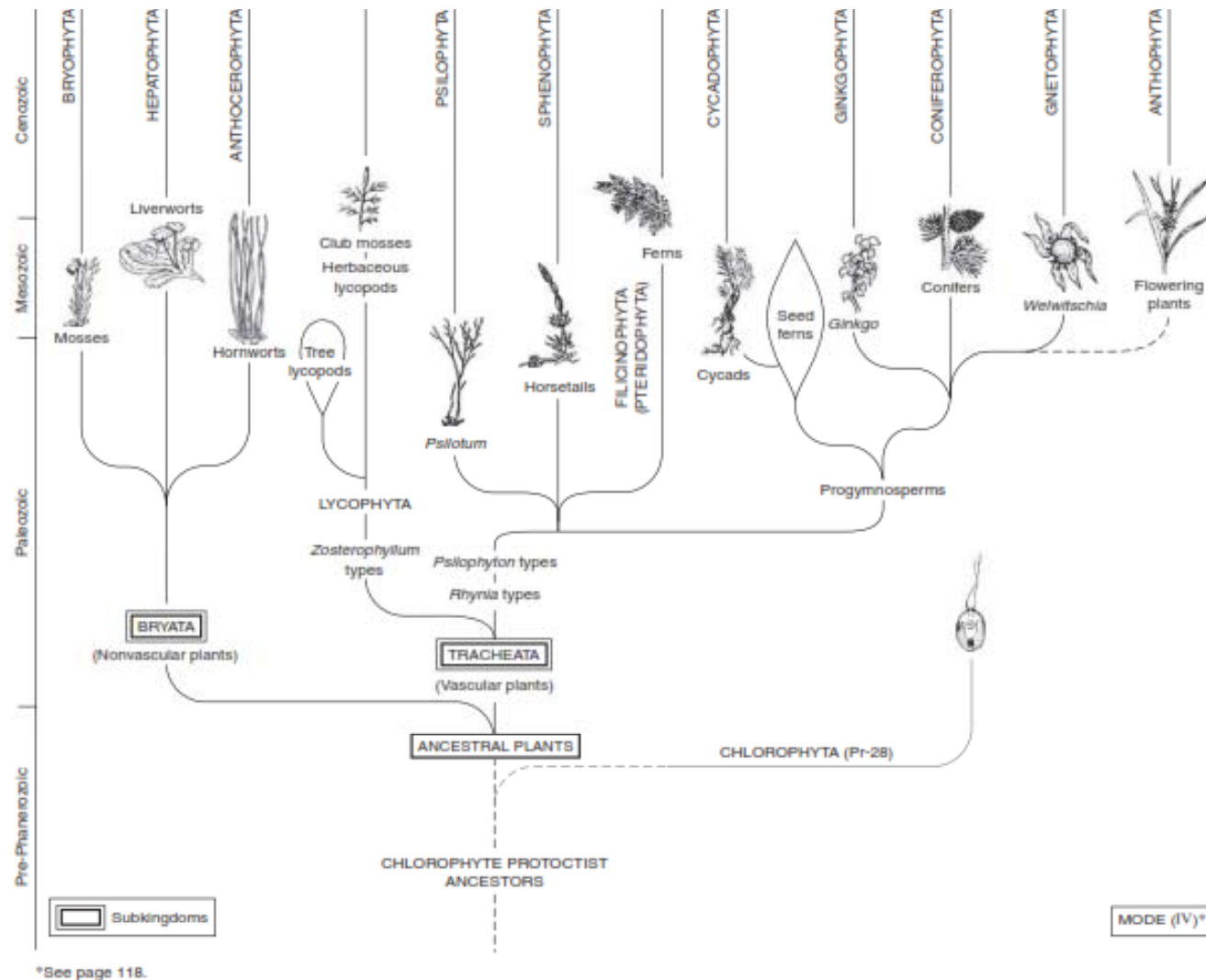
Eucariotas: Animales



Eucariotas: Hongos



Eucariotas: Plantas



***¿Qué oportunidades derivan de la
biodiversidad?***

Biotecnología



Biotecnología

- **Cualquiera** de los **organismos** (enteros o sus partes) puede ser **aplicado** para la **producción de bienes y servicios**.
- **Cualquiera** de los **organismos** puede ser **manipulado genéticamente** para su mejor utilidad.
- Dado que el **conocimiento** sobre todo lo relacionado a la **materia viva** requiere del estudio sobre la misma, han surgido los **organismos modelo** como núcleos de investigación.
- A su vez, de los **organismos multicelulares** se han logrado numerosas **líneas celulares** con capacidad de crecimiento *in vitro* para su estudio, manipulación y aplicación..

Biotecnología: Organismos modelo

<http://www.nih.gov/science/models>

**National Institutes of Health**
Model Organisms for Biomedical Research

Mammalian Models:

- Mouse
- Rat

Non-Mammalian Models:

- *S. cerevisiae* (budding yeast)
- *S. pombe* (fission yeast)
- *Neurospora* (filamentous fungus)
- *D. discoideum* (social amoebae)
- *C. elegans* (round worm)
- *Daphnia* (water flea)
- *D. melanogaster* (fruit fly)
- *D. rerio* (zebrafish)
- *Xenopus* (frog)
- *Gallus* (chicken)

Other Model Organisms:

- *Arabidopsis*

Other:

- Reports
- Funding Opportunities
- Process for Considering Support

- NIH Policy on Sharing of Model Organisms for Biomedical Research
- A User's Guide to the Human Genome
- Opportunity to Propose New Organisms for Sequencing
- Bacterial Artificial Chromosome (BAC) Resource Network
- Rate Setting Manual for Animal Research Facilities
- Final NIH Statement on Sharing Research Data
- Resource Sharing Guidelines
- What's New

We hope this web site provides you with information about national and international activities and major resources that are being developed to facilitate biomedical research using the animal models listed here. For organisms not listed, web pages may be developed in the future.

If you have suggestions as to how we can enhance the information provided, please send a message to Bettie Graham at bettie_graham@nih.gov.

Thank you for visiting our web site.

Francis S. Collins, MD, Ph.D.
Director, National Institutes of Health

Biotecnología: cultivos celulares

- A partir de **tejidos** es posible obtener **células libres** que pueden ser cultivadas en condiciones de laboratorio.

- Estas células, a las que debe suministrársele **medios complejos** con aminoácidos, antibióticos, vitaminas, fuentes de carbono, sales y factores de crecimiento, entre otros componentes, pueden ser sostenidas (repiques o pasajes) **entre 50 y 100 generaciones**.

- En tanto, algunos **cultivos de células** logran **inmortalizarse** debido a cambios genéticos, constituyendo así **líneas celulares establecidas**.

- Las **células** derivadas de **tumores**, llamadas “**transformadas**”, suelen constituir líneas inmortales.

Biotecnología: cultivos celulares



ANIMAL



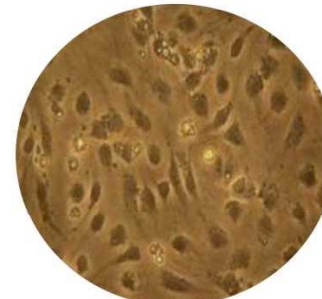
Muestra de tejido



**Tratamiento
con proteasas**



Cultivo *in vitro*



células en cultivo



Campana de flujo laminar



Estufa de cultivo celular

Biotecnología: cultivos celulares

Línea celular	Procedencia	Tipo celular de origen
MDCK	Perro	Riñón
VERO	Mono	Riñón
CHO	Hámster	Epitelio del ovario
CV-1	Mono	Riñón
NIH-3T3	Ratón	Fibroblastos de embrión
Rat-1	Rata	Fibroblastos de embrión
Hela	Humana	Carcinoma cervical
HEK-293	Humana	Riñón de embrión
LNCaP	Humana	Tumor de próstata
MCF7	Humana	Tumor de mama
Sf21	Lepidóptero	Ovario
Hi-5	Lepidóptero	Ovario
S2	<i>Drosophila melanogaster</i>	Embriones

Biotecnología: cultivos celulares

- A las **células en cultivos** se les puede **introducir DNA** exógeno.
- El procedimiento se denomina **Transfección**, a diferencia del término Transformación que se utiliza en bacterias, hongos y plantas para procesos similares.
- En general, el **DNA** que se transfecta es una **construcción genética** derivada de un clonado molecular, y su permanencia como episoma será transitoria.
- Existen **diferentes metodologías** para introducir DNA en células eucariotas

Biotecnología: cultivos celulares

PROCEDIMIENTOS DE TRANSFECCIÓN

Con fosfato de Calcio

Con lípidos

Con polímeros
catiónicos

Por electroporación

- El DNA disuelto en un *buffer* fosfato genera un precipitado en contacto con iones de calcio.
- La célula incorpora el precipitado mediante endocitosis.

- Los lípidos catiónicos forman complejos estables con el DNA.
- Estos complejos se asocian a las membranas celulares e ingresan por endocitosis.

- El DEAE-Dextrano es un polication que se asocia al DNA.
- El complejo se asocia a las membranas celulares e ingresa por endocitosis.

- El DNA ingresa por los microporos de las células al someterlas con un pulso eléctrico.

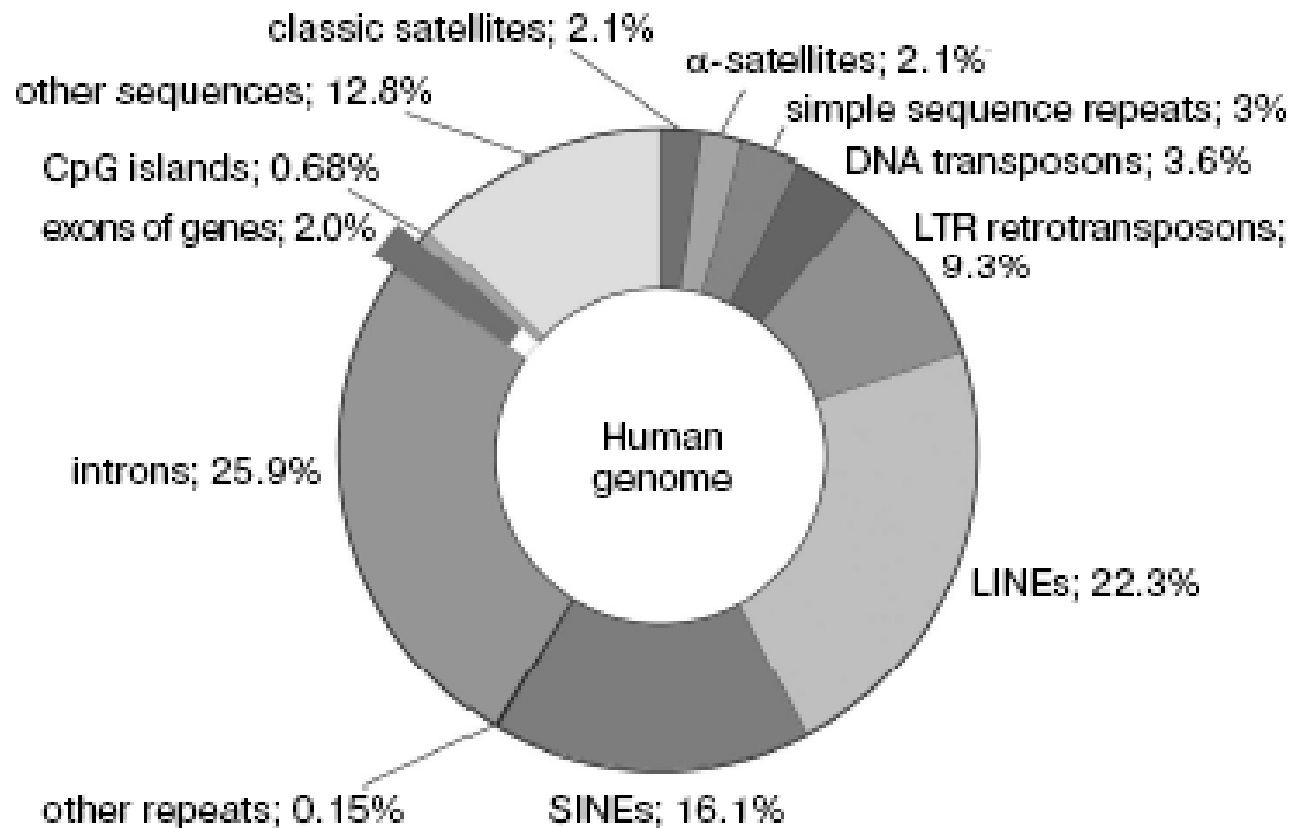
***¿Cómo se organiza la información
contenida en la materia viva?***

Organización de los genomas en los organismos

- La **unidad mínima** de la materia viva es la **célula**.
- La **información transmisible** contenida en la célula tiene su base en el **DNA**.
- Todas las **formas de vida** conocidas poseen almacenada la información en al menos **una molécula de dsDNA**.
- Muchas formas de vida poseen varios **segmentos de dsDNA informativos**. Todos ellos se denominan **genoma** (término propuesto por H. Winkler en 1920).
- Los **eucariotas**, a su vez, poseen moléculas genómicas en los **plástidos**, los cuales derivan de organismos ancestrales de vida libre. Estas moléculas también forman parte del genoma de la especie en cuestión.

Organización de los genomas en los organismos

Contenido del genoma humano



Organización de los genomas en los organismos

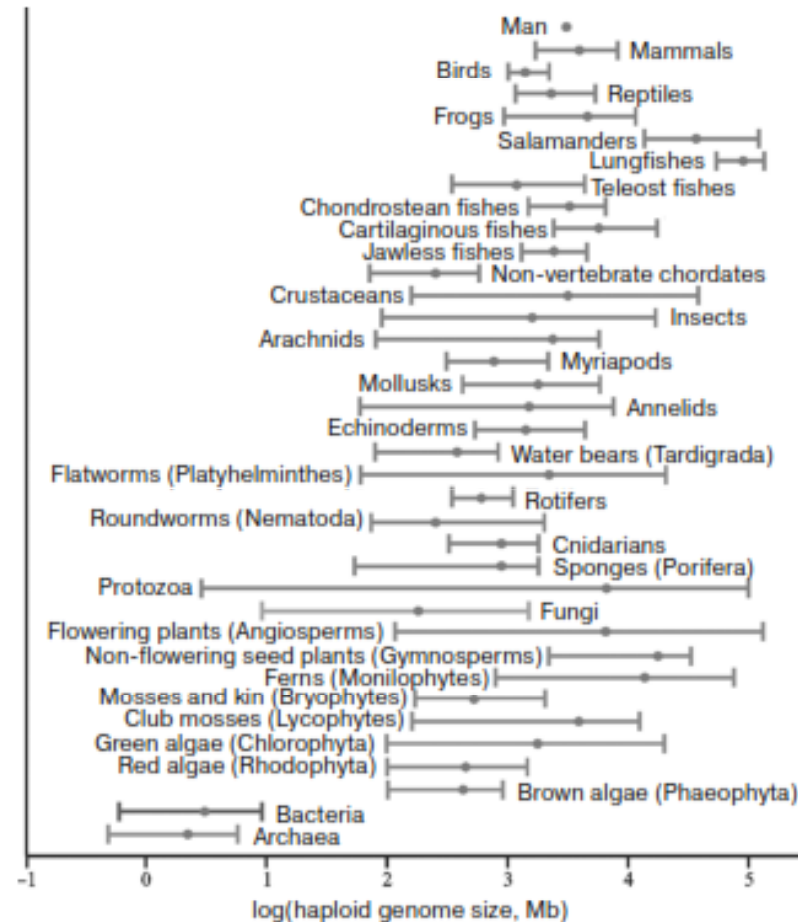
Contenido de diversos genomas

Transposon and gene content depending on genome size (after [24, 369])

Species	Common name	Genome size, pg	% TEs	Gene number
<i>Fritillaria assyriaca</i>	lily	127.4	95-99	
<i>Rana esculenta</i>	frog	5.6-8.0	77	
<i>Homo sapiens</i>	human	3.5	45	23,000
<i>Xenopus laevis</i>	frog	3.5	37	
<i>Mus musculus</i>	mouse	3.4	40	35,000
<i>Zea mays</i>	maize	2.5	60	
<i>Gallus domesticus</i>	hen	1.25	27	20,000
<i>Tetraodon nigroviridis</i>	fish	0.51	0.14	22,000
<i>Takifugu rubripes</i>	fish	0.4	2	31,000
<i>Anopheles gambiae</i>	malaria mosquito	0.28	16	14,000
<i>Drosophila melanogaster</i>	fruit fly	0.18	15-22	14,039
<i>Ciona intestinalis</i>	ascidian	0.16	10	15,500
<i>Arabidopsis thaliana</i>	arabidopsis	0.16	14	26,000
<i>Caenorhabditis elegans</i>	worm	0.1	12	20,060
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	yeasts	0.012	3-5	6,680
<i>Escherichia coli</i>	bacterium	0.0046	0.3	4,500

Organización de los genomas en los organismos

Dimensión de los genomas



Organización de los genomas en los organismos

Epigenómica

- Si bien la información contenida en la **secuencia primaria** de los **genomas** es una de las **fuentes informativas más trascendentes**, también existen otras dimensiones informacionales de impacto fenotípico y con capacidad de transmisión.
- La **epigenética** es la ciencia que estudia la **influencia** del **empaquetamiento** del DNA, la modificación de los nucleótidos mediante el agregado de **metilaciones**, y de las **histonas** mediante su **acetilación**.

***¿Cómo pueden visualizarse los
genomas?***

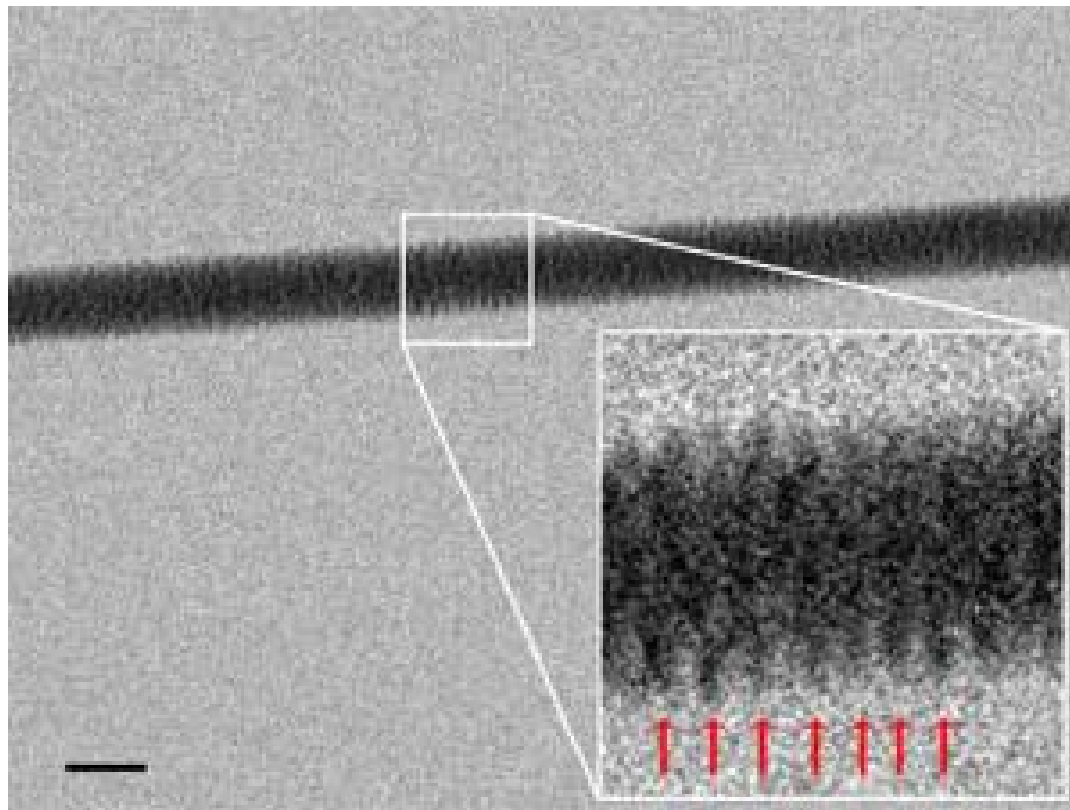
Capacidad de visualización del ser humano

Los genomas son macromoléculas de pequeñas dimensiones

					
OPTICAL EQUIPMENT	Unaided eye	Hand lens	Light microscope	Scanning electron microscope	Transmission electron microscope
(Approximate) SIZE OF SUBJECT IN METERS	$10^{-3} - 10^{-1}$	$10^{-4} - 10^{-2}$	$10^{-6} - 10^{-4}$	$10^{-8} - 10^{-2}$	$10^{-9} - 10^{-5}$

Microscopias para visualizar genomas

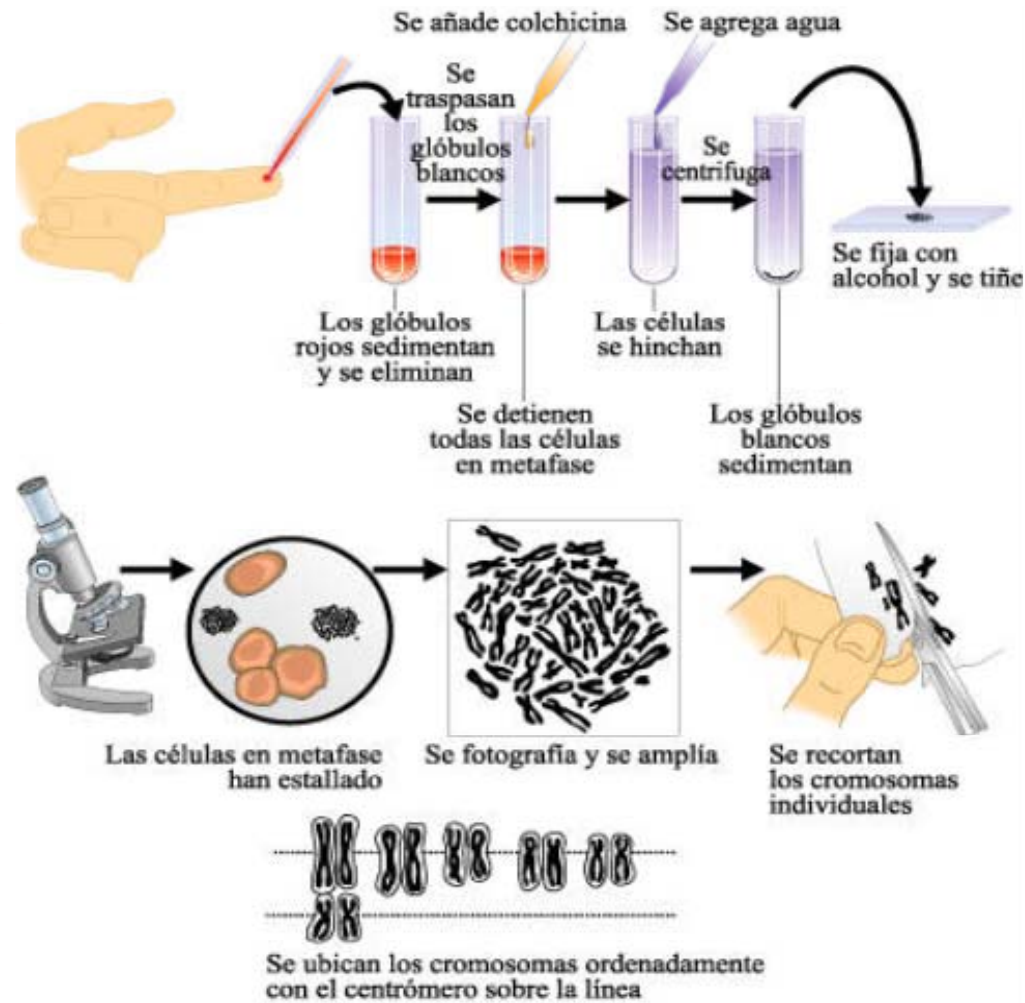
La primera fotografía de un dsDNA mediante microscopia electrónica de transmisión apareció en el año 2012.



Estudios citogenéticos

- Debido a que los genomas son muy pequeños y que las microscopías no son demasiado informativas y complejas de realizar, existen una serie de **tecnologías** relativamente sencillas capaces de analizar el contenido genómico de una célula. La disciplina que los engloba se denomina **citogenética**.
- Las principales aproximaciones **citogenéticas** son el **cariotipo** y el **FISH** (*fluorescence in situ hybridization*), ambas aplicables a los **organismos eucariotas** dado que los procariotas tienen genomas más pequeños y con menor grado de empaquetamiento.

Estudios citogenéticos



cariotipo

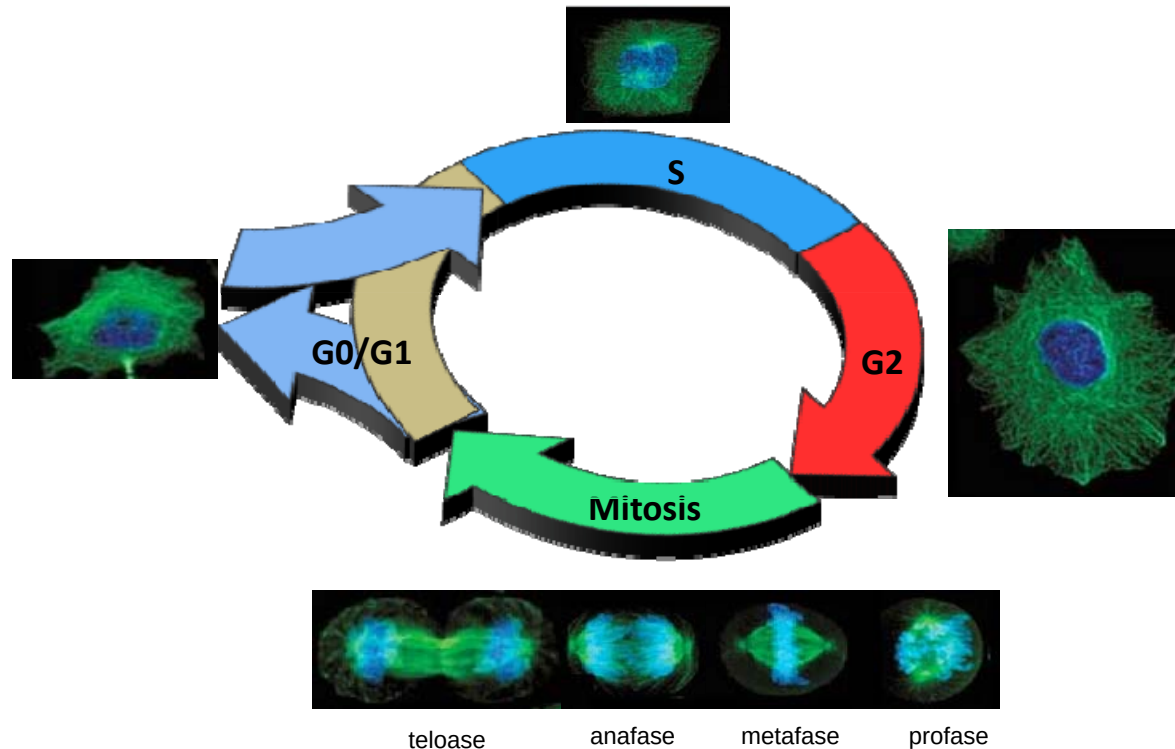
Estudios citogenéticos

El cariotipo

- El **cariotipo** es el **patrón cromosómico** de una **especie**.
- Deben analizarse más de 20 núcleos celulares.
- De acuerdo a como se tiña, pueden revelarse los **perfiles de eucromatina y heterocromatina**.
- Los **cromosomas** suelen estudiarse en la **metafase** de un ciclo mitótico.
- El **cariotipo** revela el **número de cromosomas distintos** que posee una especie.

Estudios citogenéticos

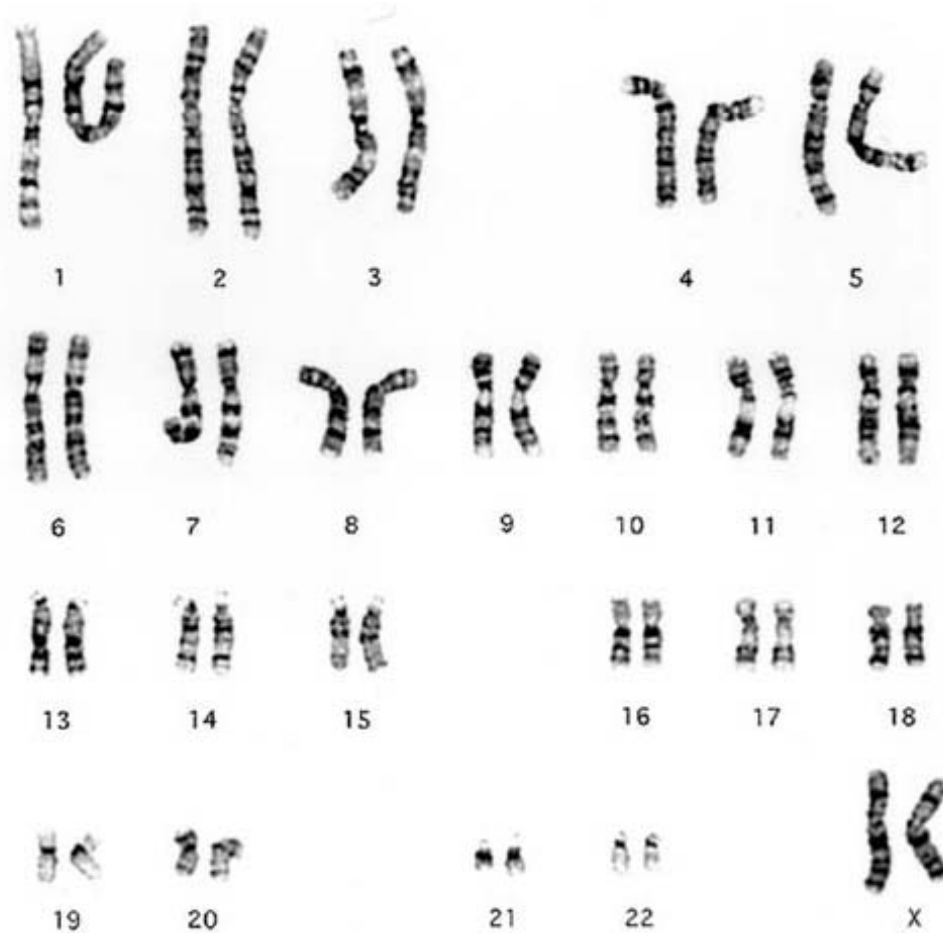
El cariotipo



Detalle del ciclo celular eucariota. Fase G_1 : puede comenzar a partir de una célula “hija” o de una célula que sale de un estadio de quiescencia (Fase G_0); durante esta fase la célula aumenta de tamaño y se sintetiza fundamentalmente nuevo material citoplásmico. Fase S: periodo en que tiene lugar la duplicación del ADN. Fase G_2 : segunda fase de crecimiento, donde se producen cambios visibles en la estructura celular que indican el principio de la mitosis o división celular. Mitosis: engloba la cariocinesis y la citocinesis. *Fotografías obtenidas de la web: <https://sites.google.com/site/nathanlents/>

Estudios citogenéticos

El cariotipo

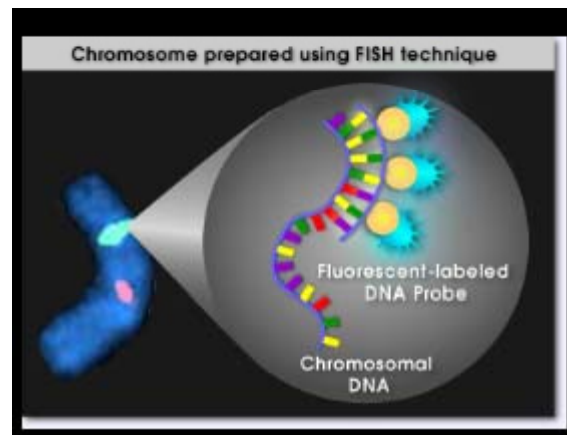


Courtesy of Dr. K. Phelan, Greenwood Genetic Center.
Noncommercial, educational use only.

Estudios citogenéticos

FISH

- La **hibridación *in situ* fluorescente** es un método que permite **detectar regiones** cromosómicas **específicas**.
- La **detección** está basada en el acoplamiento del DNA desnaturalizado con **sondas** particulares marcadas con **fluoróforos**.
- El **FISH** es una tecnología ampliamente explotada en estudios básicos y aplicados. Puede brindar **información citogenética relevante**.



Estudios citogenéticos

FISH

5. Reactivos

Hibridación

Mezcla de hibridación

- 50% Formamida
- 2XSSC
- Sulfato de Dextrano
- DNA de esperma de salmón

Detección

Enjuagues

- Formamida 50% en 2XSSC (2 baches)
- 2XSSC (2 baches)
- 2XSSC+0,1% TWEEN20 (2 baches)

Anticuerpos para detección

- Anticuerpos adecuados a la marca de la sonda
- De ser necesario, 2º anticuerpo marcado (amplificación de la señal)

Contratinción

DAPI (Diaminofenilindol)

IP (Ioduro de Propidio)

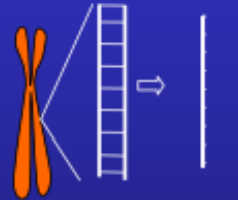
Estudios citogenéticos

FISH



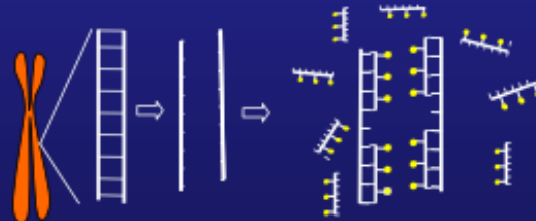
6. Metodología

- **Desnaturalización de la sonda**
Mezclar con Solución de Hibridación
Calentar 85°C 10 min.



- **Desnaturalización del DNA target**
 1. Solución de Formamida 70% 72°C
Deshidratar en alcoholes 70 - 90 - 100%
 2. Desnaturalizar en placa térmica
(Formamida de la Solución de hibridación)

• Hibridación



Sellar el cubreobjetos con cemento de contacto
Cámara húmeda 37°C ON

Estudios citogenéticos

FISH

•Detección



•Enjuague del exceso de sonda

Formamida 50%

2xSSC

Detergente (NP, Tween)

42°C

•Sonda directa

Agregar contracolorante (DAPI, PI, Br Et.)



•Sonda indirecta

1º Anticuerpo

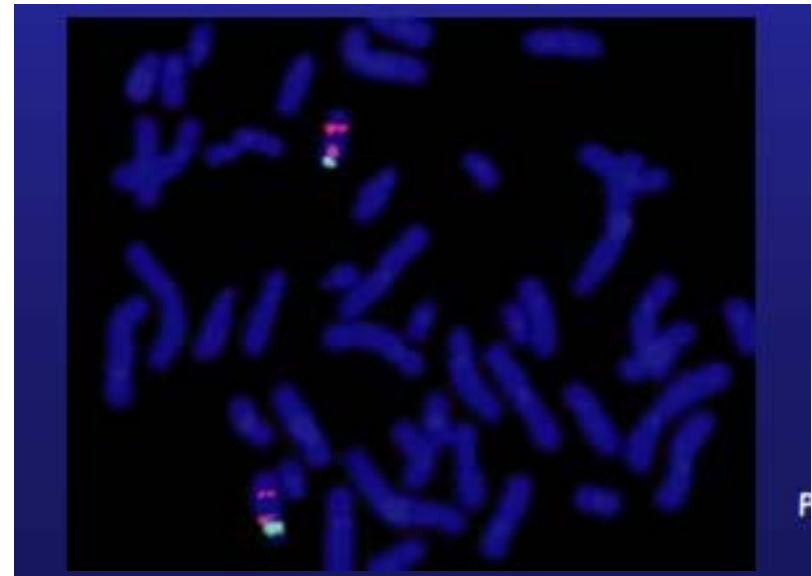
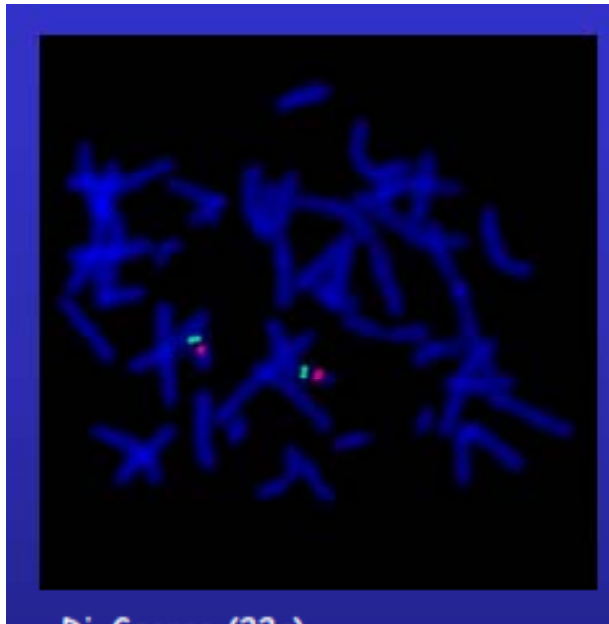
2º Anticuerpo

Agregar contracolorante (DAPI, PI, Br Et.)



Estudios citogenéticos

FISH



Estudios citogenéticos

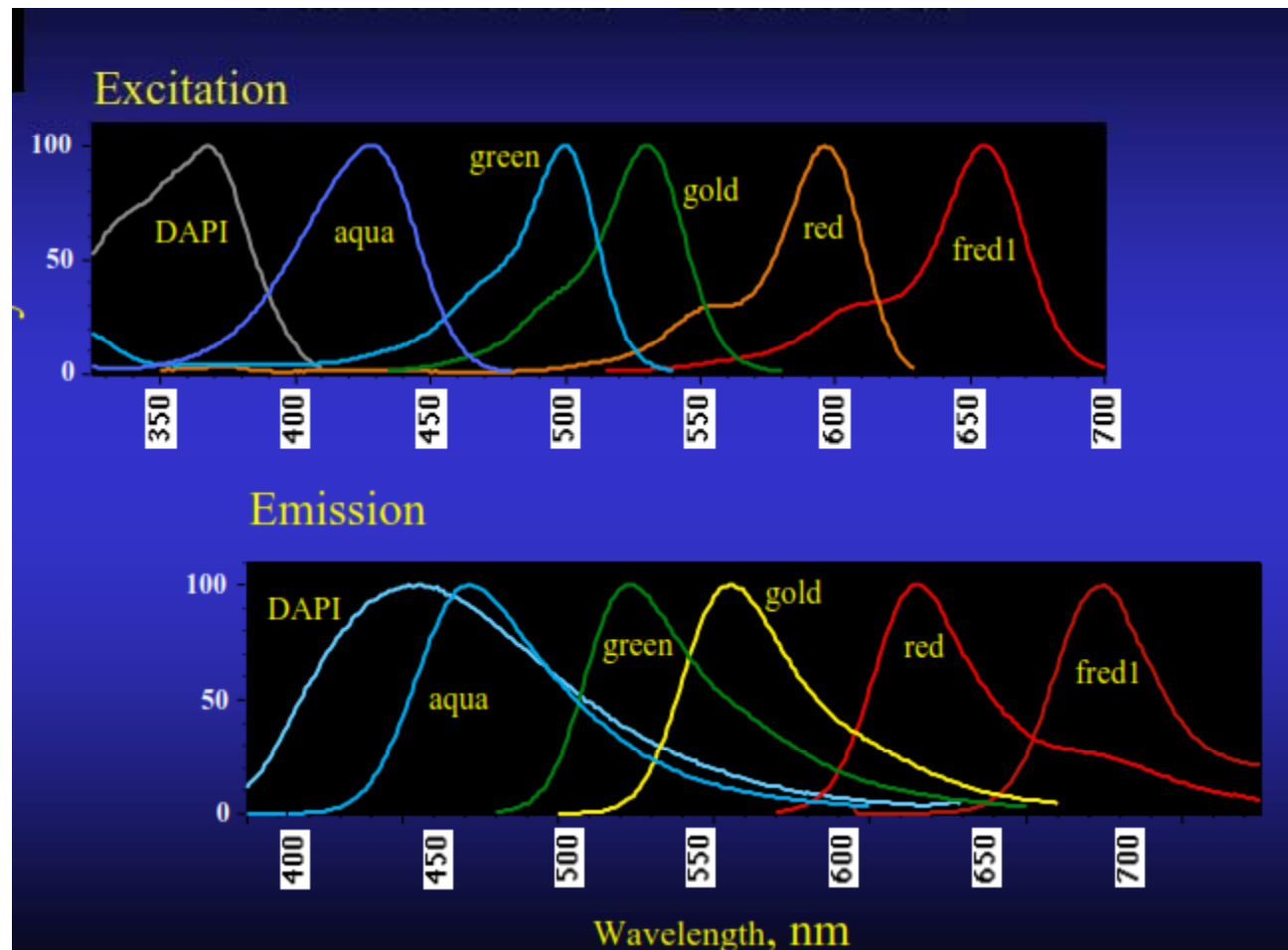
FISH

Nombre	Absorción	Emisión
FITC	495	519
Spectrum Green	497	524
Cy2	489	506
TRITC	547	572
Spectrum Orange	559	588
Cy3.5	581	596
Cromomicina A3	445	575
DAPI	367	452
Bromuro de Etidio	493	620

Algunos
Fluoróforos
disponibles

Estudios citogenéticos

FISH



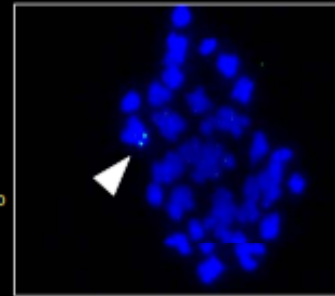
Estudios citogenéticos

FISH

Según la extensión de la región a detectar se dividen en :

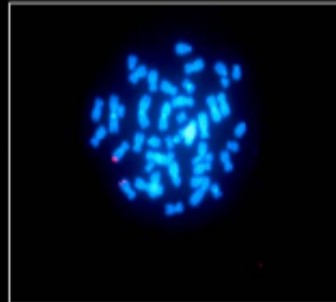
Sondas gen-específicas:

Sonda que detecta el gen cuya delección causa el síndrome Cri-du-chat. En esta foto sólo se detecta un cromosoma con este gen, por lo tanto su cromosoma homólogo tiene la delección.

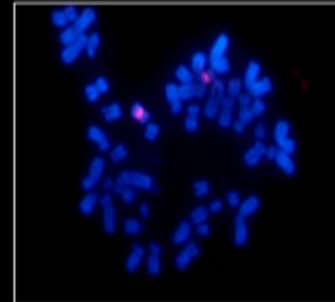


Sondas región específicas:

Región terminal (telomérica)
Cromosoma 9



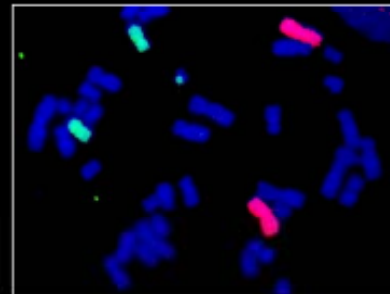
Región centromérica
Cromosoma 16



Sondas de pintado cromosómico total:

o WCP (Whole chromosome painting)

Cromosomas
3 y 9



Estudios citogenéticos

FISH: Diseño de sondas

Cuando no se conocen secuencias específicas es posible realizar sondas a partir de la microdissección de cromosomas.

Los pasos para su elaboración son:

- 1-** Microdissección.
- 2-** Amplificación inespecífica.
- 3-** Amplificación específica.
- 4-** Marcado
- 5-** FISH

Estudios citogenéticos

FISH: Diseño de sondas

1- Microdissección

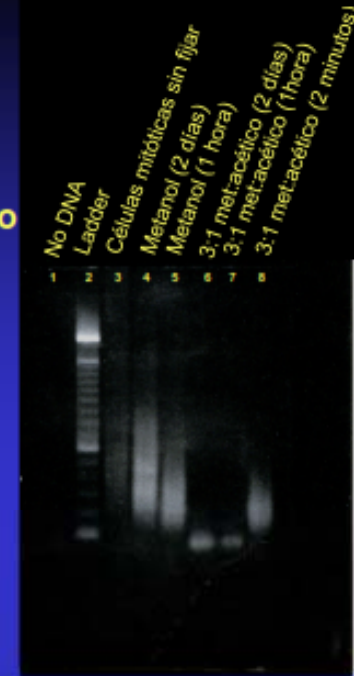
Fijaciones citogenéticas

- Frescas
- Mínimo tiempo posible en contacto con Acido acético
- Mantenidas en metanol preferentemente a -85°C

Chromosome Microdissection. Mühlmann Díaz M, Christian A and Bedford JS. Tenth international Congress of Radiation Research. 1995

Cubreobjetos

- Recién goteados
- Correctamente identificados
- Bien teñidos
- Bien centrados



Estudios citogenéticos

FISH: Diseño de sondas

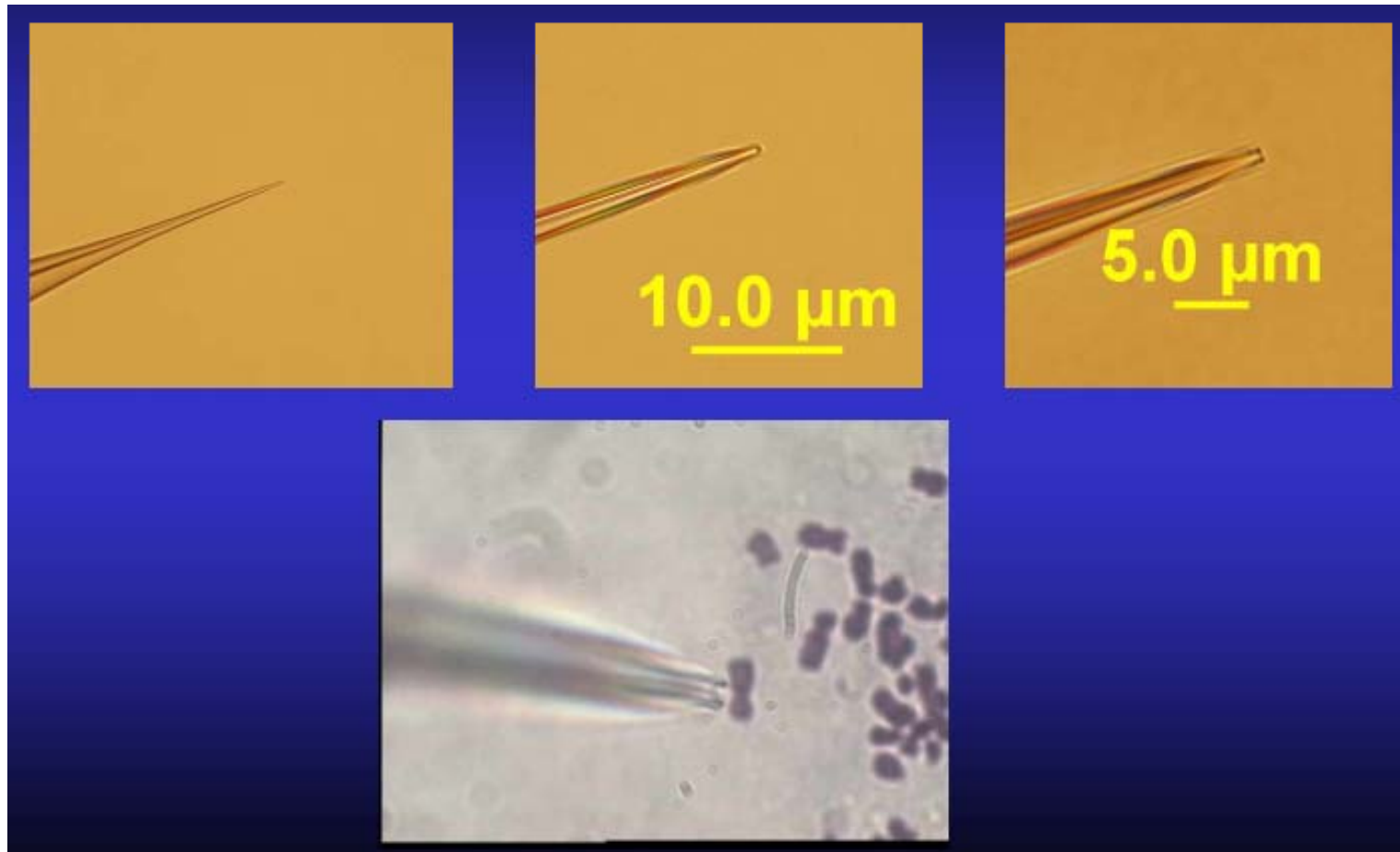
(Equipos necesarios)

•Agujas



Estudios citogenéticos

FISH: Diseño de sondas



Estudios citogenéticos

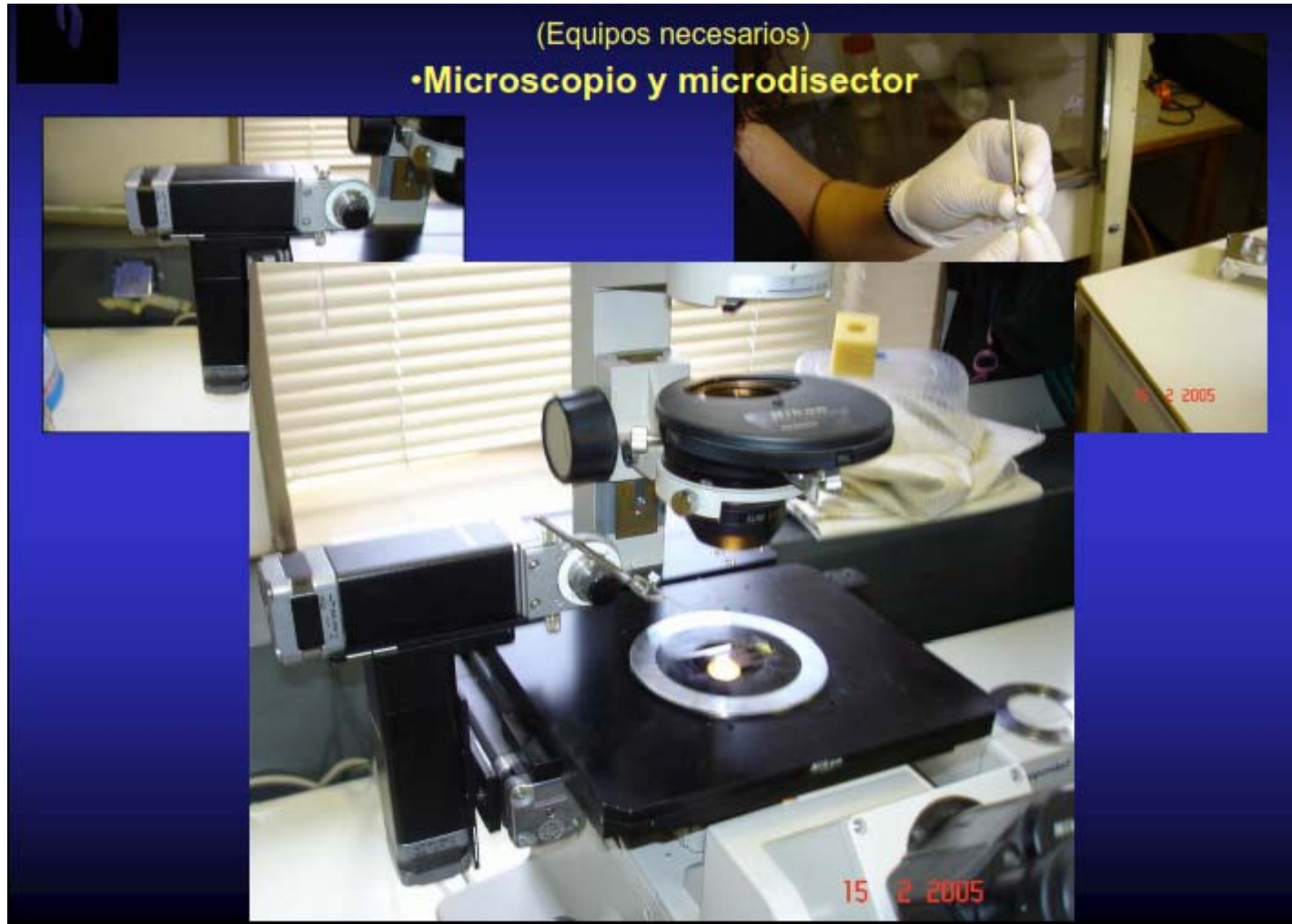
FISH: Diseño de sondas

•Microscopio y microdisector



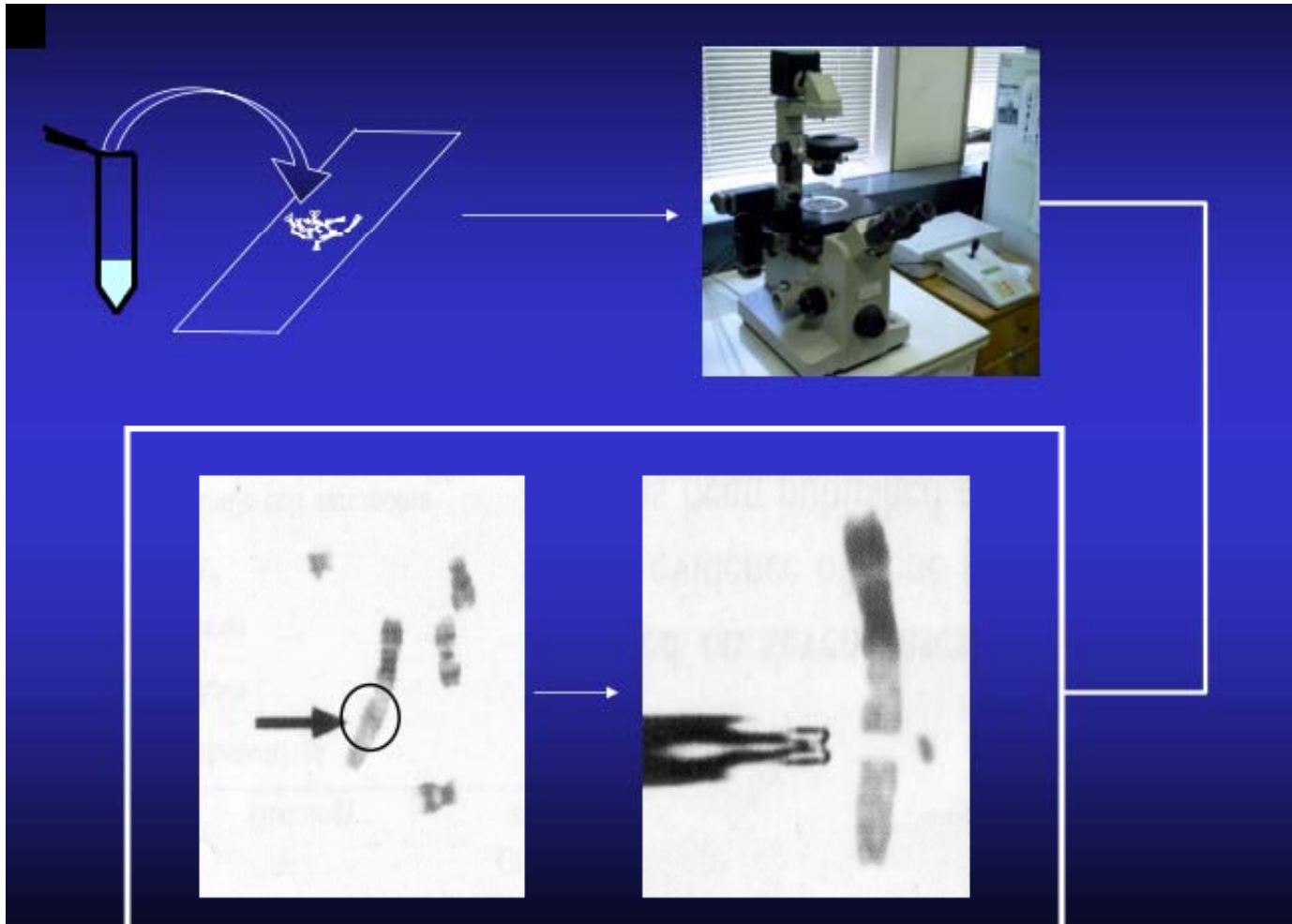
Estudios citogenéticos

FISH: Diseño de sondas



Estudios citogenéticos

FISH: Diseño de sondas



Estudios citogenéticos

FISH: Diseño de sondas

2- Amplificación inespecífica



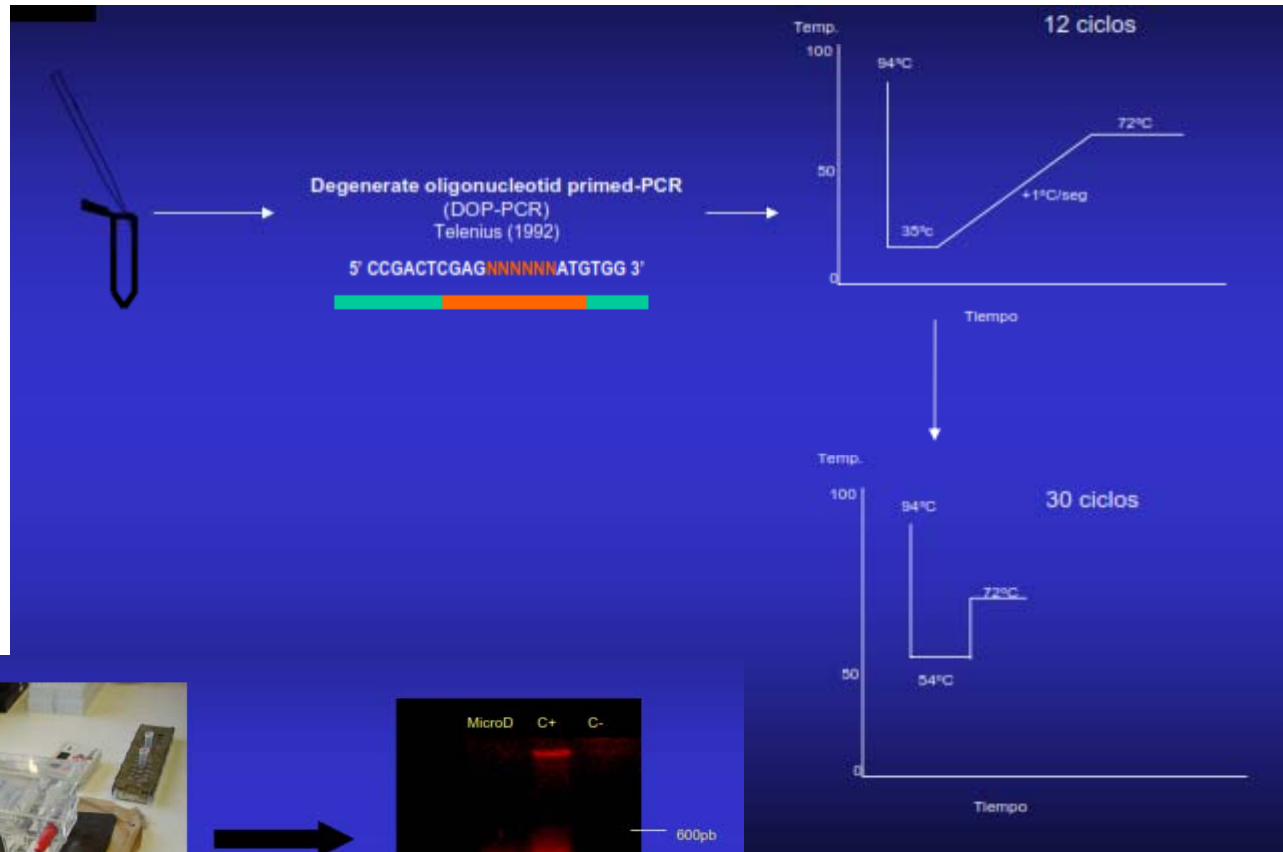
DOP PCR (Volumen final 25µl)

•Buffer PCR	2,5
•Mg ₂ Cl	5mM
•Primers DOP	2µM
•dNTP's	200µM
•H ₂ O	Hasta 25µl

DOP-PCR: Degenerated Oligonucleotide-Primed PCR

Estudios citogenéticos

FISH: Diseño de sondas

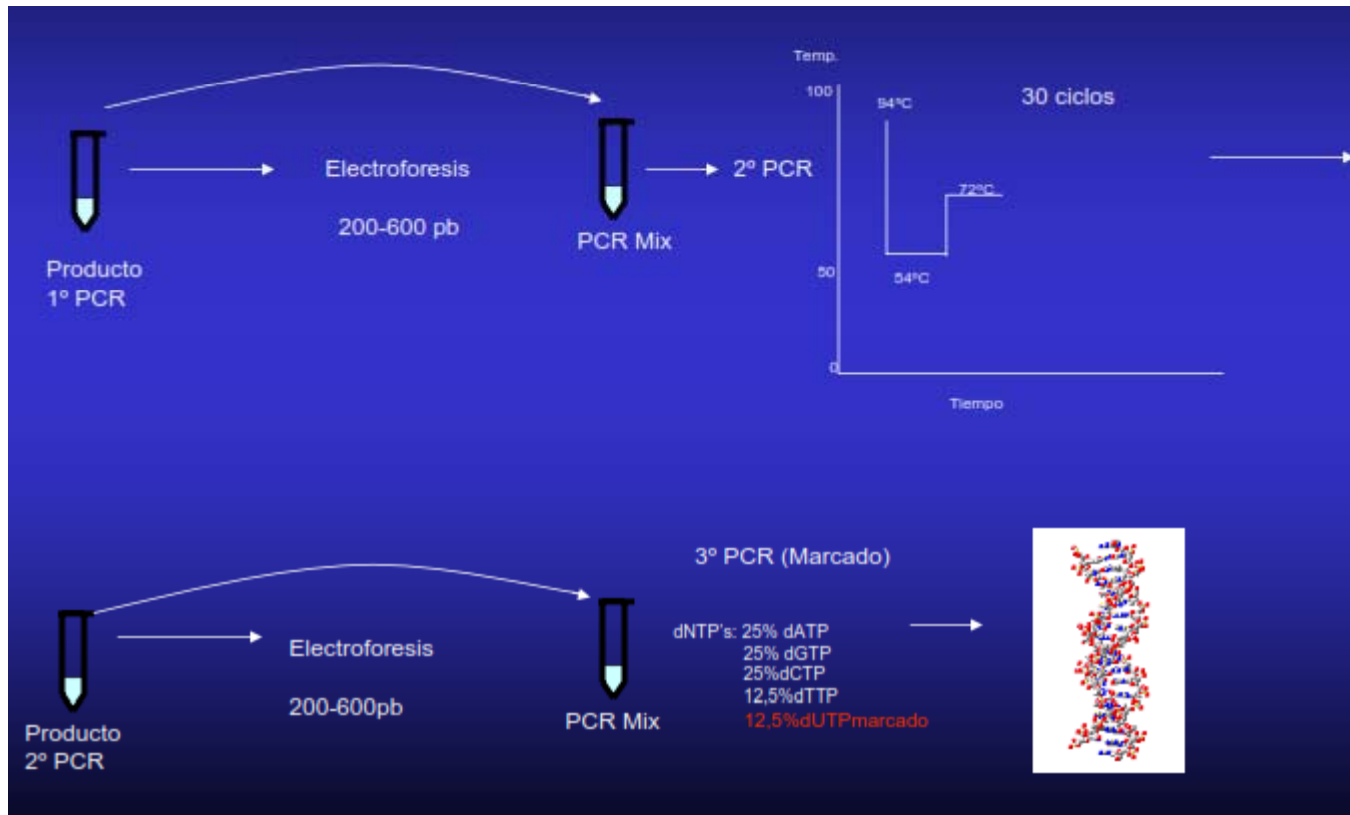


Estudios citogenéticos

FISH: Diseño de sondas

3- Amplificación específica

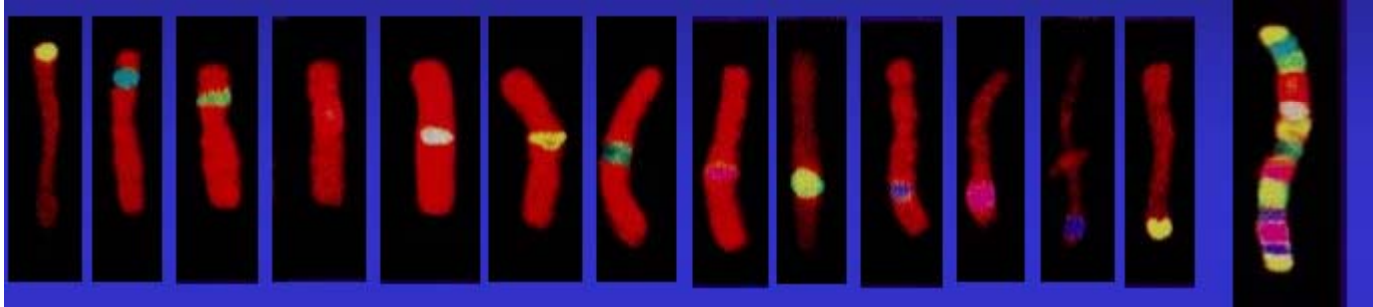
4- Marcado



Estudios citogenéticos

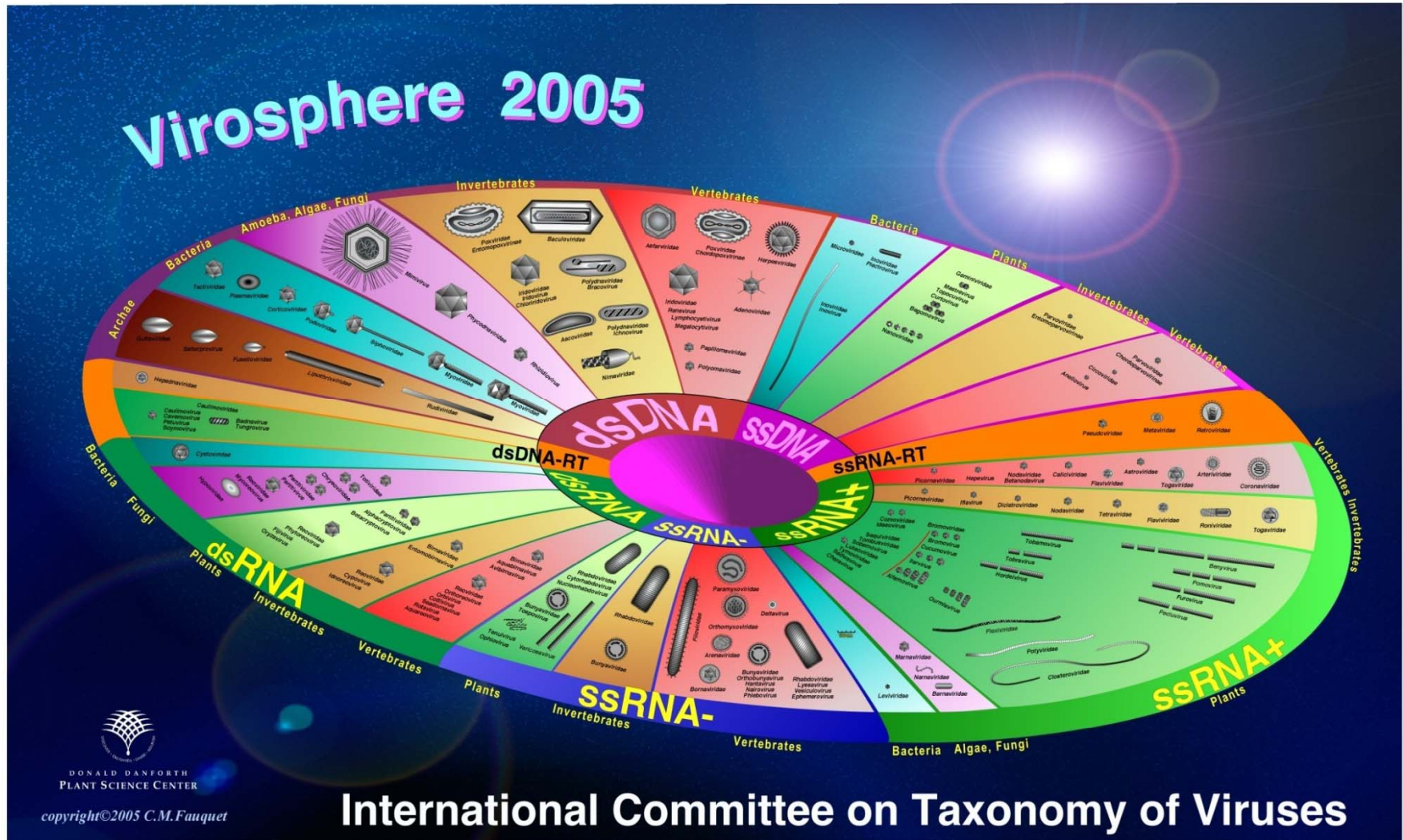
FISH: Diseño de sondas

5- FISH



¿Cuál es la diversidad de virus?

Diversidad de Virus



Diversidad de Virus

- Los **virus** son **entidades parásitas** de los organismos, ya que los utilizan para poder multiplicar.
- Los **genomas virales** son muy **diversos** en naturaleza y longitud.
- El análisis de la naturaleza de los genomas virales involucra una primera instancia de estudio de susceptibilidad a enzimas diferentes.