



Facultad de Agronomía,
Zootecnia y Veterinaria



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE TUCUMÁN

Serie Didáctica N° 99

Biotecnología y Genética Molecular

Aguirre C.M., Herrero M.I., Budeguer C.J.



ISBN: 978-987-754-389-6

Aguirre, Constanza María

Biología y Genética Molecular / Constanza María Aguirre ; María Inés Herrero ; Carlos Jorge Budeguer. - 1a edición para el alumno - San Miguel de Tucumán : Universidad Nacional de Tucumán. Facultad de Agronomía, Zootecnia y Veterinaria, 2024.

Libro digital, PDF

Archivo Digital: descarga y online

ISBN 978-987-754-389-6

I. Genética. I. Herrero, María Inés II. Budeguer, Carlos Jorge III. Título
CDD 576.5

BIOTECNOLOGÍA Y GENÉTICA MOLECULAR

Aguirre C.M.^{1,2}; Herrero M.I.²; Budeguer C.J.^{2*}

¹ E.E.A. Famaillá, INTA. Ruta Provincial 301 - Km 32, Famaillá, Tucumán.

² Facultad de Agronomía, Zootecnia y Veterinaria, UNT. Av. Gral. Roca 1900, San Miguel de Tucumán, Tucumán.

carlos.budeguer@faz.unt.edu.ar

Índice

Introducción.....	2
Importancia y beneficios	2
Ingeniería genética y tecnología del ADN recombinante.....	3
Vectores	4
Plásmidos	4
Fagos	5
Cósmidos	6
Enzimas de restricción	6
ADN Ligasas.....	7
Construcción de moléculas de ADN recombinante.....	7
Clonación.....	9
Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	10
Aplicaciones de la biotecnología.....	13
Biotecnología microbiana	13
Biotecnología vegetal	13
Marcadores moleculares	13
Tipos de marcadores moleculares	14
RFLP (Polimorfismo en el tamaño de los fragmentos de restricción)	14
RAPD (ADN polimórfico amplificado al azar)	14
AFLP (Polimorfismo de la longitud de los fragmentos amplificados)	14
SSR (Secuencias de Repetición Simple) o "microsatélites"	14
SNP (polimorfismo de nucleótido simple).....	15
Transgénesis	16
Plantas transgénicas	16
Animales transgénicos	17
Consideraciones bioéticas	18

Introducción

En un sentido amplio, el concepto de biotecnología proviene de la unión de los términos “bio”, vida más “tecnología”, es decir, el uso de procesos biológicos para elaborar productos o resolver problemas (Muñoz de Malajovich, 2012)

En una acepción más general, se la puede definir como la aplicación de principios científicos y de ingeniería que mediante agentes biológicos produce bienes y servicios (Navarro *et al.*, 2005). Cuando hablamos de agentes biológicos nos referimos a organismos vivos (levaduras, hongos, bacterias, plantas o animales) o partes de ellos, como ser su ADN o ARN. Es así como a lo largo de la historia, se emplearon microorganismos para la elaboración del vino, el pan, el yogurt y el queso, por dar algunos ejemplos.

Si bien el término biotecnología es bastante actual, el hombre ha utilizado organismos en su beneficio durante miles de años en lo que se denomina “Biotecnología tradicional”. Tanto chinos como griegos, romanos, babilonios y egipcios, han hecho uso de la biotecnología desde el año 2000 a.c., aproximadamente (Thieman y Palladino, 2010).

La Biotecnología moderna, es el uso de la Ingeniería Genética y la tecnología del ADN recombinante para el mejoramiento animal y vegetal, así como la producción en fármacos, enzimas y otras moléculas de interés humano.

Es una ciencia interdisciplinaria dado que tiene relación con diferentes ciencias como ser: la bioquímica, la genética, la biología molecular, la microbiología, la ciencia y tecnología de los alimentos, la bioinformática, entre otras.

Importancia y beneficios

Esta ciencia tiene gran importancia debido al sinfín de procesos en los que interviene, entre los que podemos mencionar: i) Procesos de fermentación para la elaboración de quesos, yogurt, pan, bebidas alcohólicas como el vino y la cerveza (Figura 1); ii) mejoramiento genético en agricultura y ganadería; iii) uso de antibióticos, el cual se inicia con el descubrimiento de la Penicilina por parte de Alexander Fleming; iv) clonación e ingeniería genética, entre otros.

Dentro de las ciencias agrarias, la biotecnología juega un papel importante en diferentes procesos. En este punto podemos hablar de biotecnología agrícola y biotecnología animal. Pero antes de adentrarnos específicamente en la aplicación de la biotecnología haremos un recorrido sobre conceptos básicos que son ampliamente necesarios para el entendimiento y desarrollo de la misma.

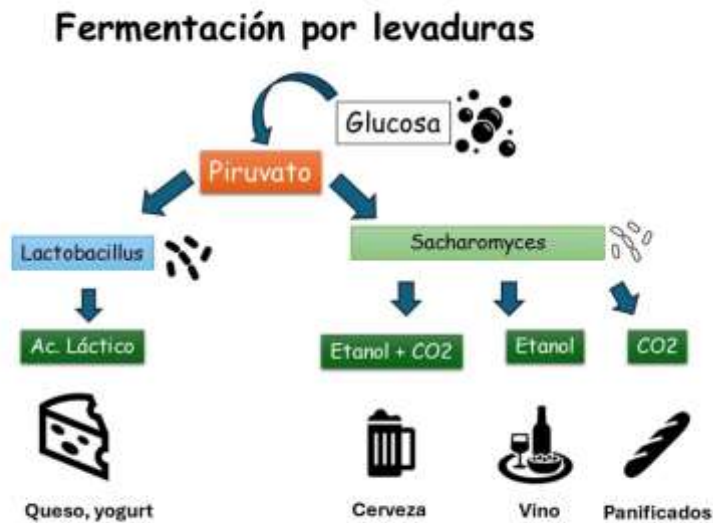


Figura 1. Procesos fermentativos y su relación con la biotecnología.

Ingeniería genética y tecnología del ADN recombinante

La capacidad de manipular ADN y conocer las secuencias de los genes en combinación con la necesidad de entender en detalle la estructura y función de estos, ha revolucionado la forma de aproximarnos a la genética y promovido el desarrollo de un nuevo campo de la biología: la **genética molecular**. La genética molecular estudia todo lo relacionado con la manipulación del ADN y del ARN. De esta manera podemos inferir el concepto de **ingeniería genética** como una tecnología o conjunto de técnicas, procesos y herramientas genéticas avanzadas que se utilizan para modificar el contenido genético de un organismo, es decir, su ADN.

A través de la ingeniería genética, los científicos pueden combinar el ADN de diferentes organismos. Este proceso, llamado **tecnología del ADN recombinante**, se emplea para producir muchas proteínas de uso médico como la insulina, la hormona del crecimiento humano y factores coagulantes (Thieman y Palladino, 2010). La tecnología del ADN recombinante ha dado lugar a cientos de aplicaciones en las ciencias agrarias, como ser el desarrollo de plantas resistentes a ciertos productos químicos (herbicidas), plagas y enfermedades, cultivos de frutas o vegetales de elevada productividad, el “arroz dorado” creado para ser más nutritivo por su contenido de vitamina A, y bacterias modificadas genéticamente con capacidad para degradar contaminantes medioambientales.

A finales de la década de los sesenta, muchos científicos estaban interesados en la combinación de genes y especularon que sería posible cortar y pegar porciones del ADN proveniente de diferentes orígenes, lo que dio origen a la tecnología del ADN recombinante, la cual consiste en aislar segmentos de ADN específicos e introducirlos en otro genoma.

Las herramientas más utilizadas en la manipulación del ADN son:

1. Vectores
2. Enzimas de restricción
3. ADN ligasas

Vectores

Fragmentos de ADN pequeños que sirven para transferir material genético de un organismo a otro, es decir, son capaces de mover genes. Un vector se define como una molécula de ADN de doble cadena, con capacidad de albergar un fragmento de ADN exógeno (de otro origen). Los biólogos moleculares han trabajado para desarrollar diferentes tipos de vectores de ADN, cada uno con sus beneficios particulares dependiendo de los objetivos buscados. Dentro de los vectores se pueden mencionar: plásmidos, fagos, cósmidos, entre otros.

Plásmidos

Los plásmidos son pequeñas moléculas circulares de ADN que se replican y se transmiten con independencia del cromosoma bacteriano. De manera natural constituyen el material genético móvil de las bacterias, funcionando como medio de transporte de genes hacia otras bacterias y otorgando resistencia a antibióticos. Los plásmidos tienen la capacidad de replicarse en forma independiente en la célula; la incorporación de los fragmentos de ADN en un plásmido permite la replicación de este ADN junto a los genes del plásmido y de esta manera se logra obtener grandes cantidades de ADN que llevan el fragmento de interés (Figura 2). El plásmido Ti es uno de los más usados en biotecnología vegetal para insertar genes de interés en plantas (Figura 3).

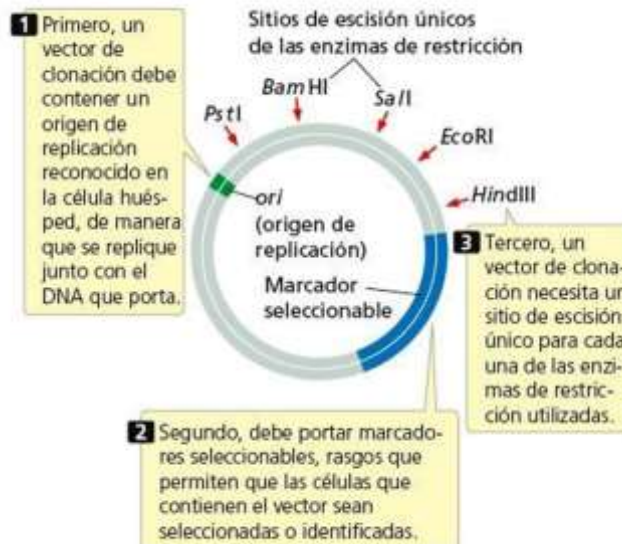


Figura 2. Un vector de clonación, como ser un plásmido, posee un origen de replicación, uno o más marcadores seleccionables y uno o más sitios de restricción. Tomado de Genética: un enfoque conceptual, 5^o ed., (p. 541), por Pierce, 2015, Medica Panamericana.

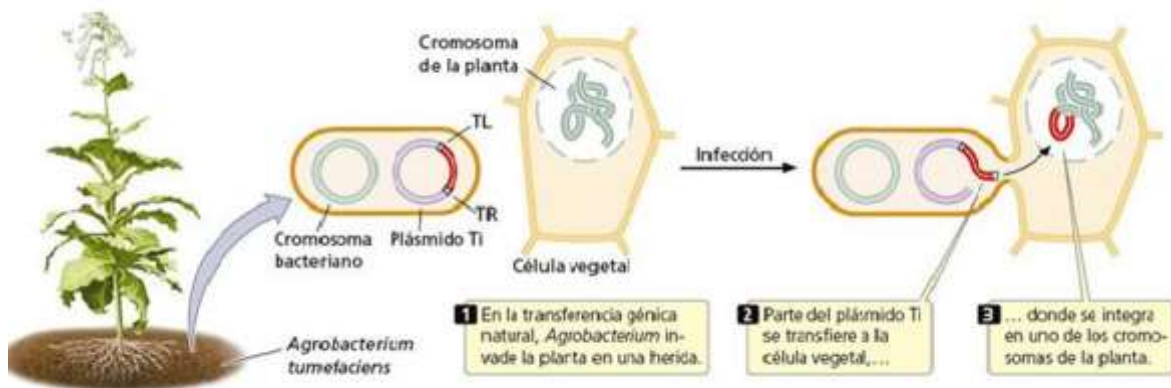


Figura 3. El plásmido Ti se puede utilizar para transferir genes a las plantas. Tomado de Genética: un enfoque conceptual, 5º ed., (p. 545), por Pierce, 2015, Medica Panamericana.

Fagos

Los fagos o bacteriófagos, son virus que infectan naturalmente a las bacterias y se multiplican haciendo uso de la maquinaria biosintética de las mismas. Los mismos se estudian en la resistencia a los antibióticos. Los bacteriófagos se unen a la bacteria patógena huésped, introducen su material genético, se replican en su interior y la destruyen. Se replican de forma autónoma, portan información genética y pueden conferirle a la bacteria nuevas propiedades o desarrollarle procesos patológicos. El bacteriófago lambda es el fago más utilizado como vector de clonación; su genoma consiste en una molécula lineal de aproximadamente 45000 pb y poseen sitios *cos* para “circularizar” su genoma a través de la acción de una ligasa de la célula huésped (Figura 4).

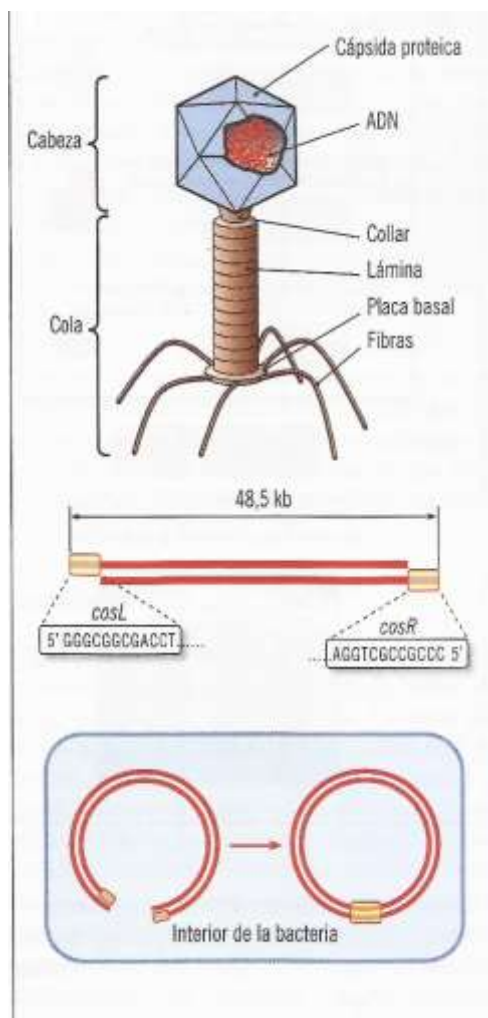


Figura 4. Estructura del Bacteriófago lambda (λ). Tomado de *Genética. Conceptos esenciales* (p. 404), por Benito C., Espino Nuño F.J., 2012, Médica Panamericana.

Cósmidos

Son vectores híbridos del ADN de un plásmido (proporciona la resistencia a los antibióticos) y los sitios *cos* del bacteriófago (le permiten empaquetar el ADN). Algunos estudios de análisis de ADN genómico requieren de la clonación de fragmentos de ADN grandes. En estos casos, es recomendable utilizar los cósmidos ya que pueden aceptar insertos de hasta 45 kb. Pueden replicarse de manera independiente del genoma bacteriano, como lo hacen los plásmidos.

Enzimas de restricción

Son enzimas capaces de cortar el ADN en sitios específicos. Fueron descubiertas en 1970 en bacterias; también se denominan *endonucleasas* (endo: “dentro de”, y nucleasa: “enzima cortadora de ácido nucleico”) tienen como función reconocer y cortar ADN extraño en secuencias específicas de nucleótidos. A estas enzimas las producen en forma natural las bacterias para defenderse contra los virus. La mayor parte de las secuencias de

reconocimiento son **palíndromos**, es decir que se leen de la misma manera hacia adelante o hacia atrás de cada cadena del ADN.

Ej: 5' A C G T 3'
3' T G C A 5'

Cada una de las enzimas toma el nombre de la bacteria de la cual ha sido aislada. Ej.: Eco RI es la primera enzima de restricción identificada de *Escherichia coli*. Las enzimas de restricción actúan como tijeras moleculares. Se conocen más de 100 y cada una corta en una secuencia específica a cada hebra de ADN, denominadas **secuencias de reconocimiento o posición de restricción**. Pueden cortar en el mismo lugar de las dos cadenas y generar extremos romos o en posiciones distintas generando extremos cohesivos o pegajosos porque son complementarios entre sí y conectan los fragmentos de manera espontánea. Si se mezclan dos preparaciones de ADN de diferente origen, pero tratados con la misma enzima de restricción, los extremos cohesivos hacen posible la formación de híbridos por un apareamiento por complementariedad (Pierce, 2015). Un ejemplo es la enzima *EcoRI* que se aísla de *Escherichia coli* y que genera extremos cohesivos al cortar en G de la secuencia:

5' -GAATTC- 3'
3' -CTTAAG- 3'

ADN Ligasas

La ADN ligasa es una enzima que une cadenas de ADN. Si dos fragmentos de ADN tienen extremos complementarios, la ligasa puede unirlos para formar una molécula única e intacta de ADN. La ADN ligasa sella el espacio entre las moléculas para formar un solo fragmento de ADN. Por esta función, radica la importancia de esta enzima en la replicación del ADN y la tecnología del ADN recombinante.

Construcción de moléculas de ADN recombinante

La estrategia para construir o formar una molécula de ADN recombinante consta de cinco pasos:

1) **Cortar el ADN** de interés en sitios específicos de una manera exacta y con bastante fidelidad. Para esto se emplea un grupo de *enzimas de restricción*, empleadas para poder aislar el ADN de interés, mediante los cortes que realizan en un sitio determinado que cada una reconoce (Loenen *et al.*, 2014).

2) **Seleccionar** una molécula de ADN transportadora (vectores de clonación) que actúa como un vehículo transportador capaz de replicarse de forma autónoma e independiente dentro del huésped (plásmidos o bacteriófagos).

3) **Ligar** o pegar los dos fragmentos de ácido desoxirribonucleico (ADN). En este caso se utilizan las ADN ligasas, que tienen la capacidad de “pegar” o unir fragmentos de ADN, es decir, son las encargadas de realizar el enlace fosfodiéster entre las cadenas de ADN (Berg *et al.*, 2008).

4) **Introducir** el ADN al interior de la célula huésped; aquí se utilizan metodologías que facilitan el ingreso de la molécula de ADN recombinante. Existen varias formas de realizar esto, y dependerá del tipo de célula huésped (procariota o eucariota) que se utilice. Los procariotas, como es el caso de las bacterias, pueden intercambiar material genético por

medio de **transducción** (transferencia de ADN por medio de un bacteriófago), por **conjugación** (transferencia de ADN que requiere el contacto célula-célula) y por **transformación** (mecanismo mediante el cual una bacteria capta ADN del medio y lo recombina con el propio) (Figura 5). Tanto la transducción como la conjugación son procesos que ocurren naturalmente en las bacterias; sin embargo, la transformación se puede realizar en laboratorio y es la más utilizada para introducir material genético; se enfoca en generar pequeños poros en las células para que pueda ingresar el ADN recombinante al interior, donde podrá replicarse cientos de veces con ayuda de la maquinaria de replicación de la propia célula huésped (Luque y Herráez, 2006; Berg *et al.*, 2008; Baeshen *et al.*, 2014).

5) **Selección o identificación** de las células que contienen el ADN recombinante. Actualmente se dispone de vectores que contienen genes con resistencia a antibióticos que nos facilitan la identificación de las células con ADN recombinante. Es decir, al tener un gen de resistencia, las bacterias que contengan el plásmido serán capaces de crecer en la presencia del antibiótico, mientras que aquellas que no contengan el plásmido recombinante no podrán crecer en un medio con antibiótico, haciendo posible su selección e identificación (Luque y Herráez, 2006).

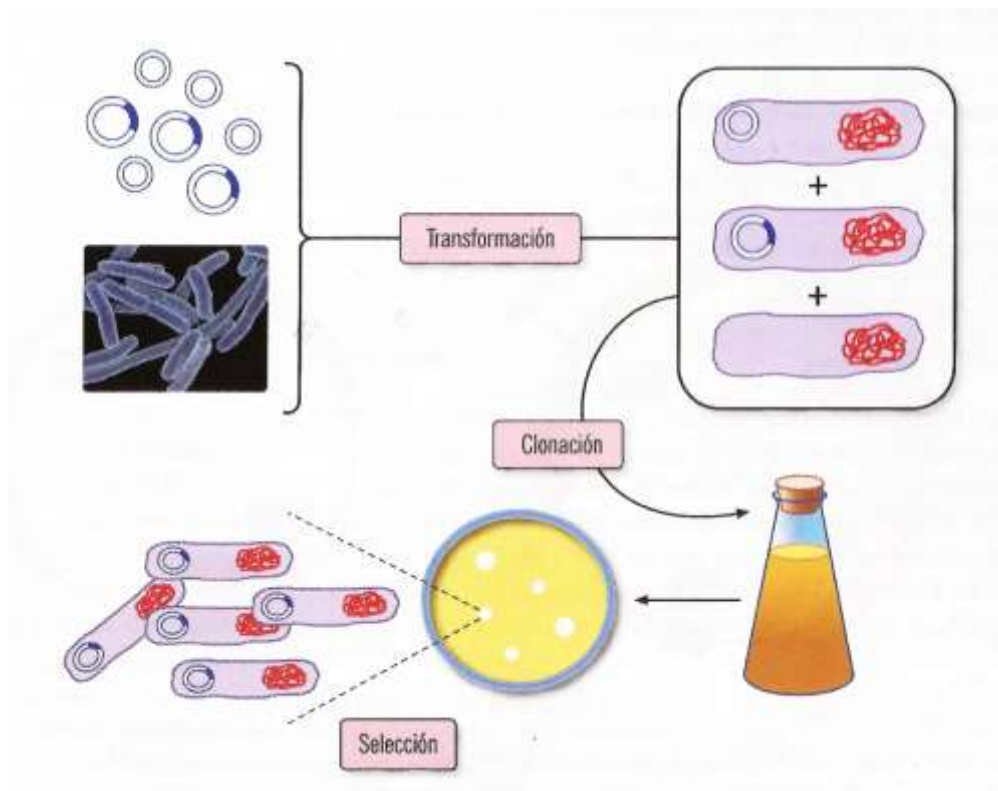


Figura 5. Amplificación de moléculas de ADN recombinante (vector más fragmento de ADN). Las moléculas se introducen en células huésped -transformación- las cuales se amplifican -clonación- y posteriormente se seleccionan en medios de cultivo apropiado. Tomado de *Genética. Conceptos esenciales* (p. 403), por Benito C., Espino Nuño F.J., 2012, Médica Panamericana.

Es así que podemos ver como la tecnología del ADN recombinante se utiliza normalmente para hacer posible la clonación de genes, mientras que la ingeniería genética se basa en el

uso de la tecnología del ADN recombinante y en la clonación de genes a los fines de modificar el genoma de un organismo.

El primer producto genético obtenido por esta tecnología fue la **insulina humana**. Esta hormona es producida de manera natural por células pancreáticas cuando los niveles de glucosa en sangre aumentan. El rol de esta proteína es bajar estos valores de glucosa posibilitando su almacenamiento en forma de glucógeno en el hígado y en células musculares. La no producción de insulina produce una enfermedad denominada diabetes. Inicialmente la insulina se obtenía de vacas o cerdos, sin embargo, en la actualidad se clonan genes humanos en plásmidos de ADN y se replican en bacterias mediante la tecnología del ADN recombinante para obtener insulina sintética.

Clonación

Las herramientas descritas anteriormente juegan un papel clave en la biología molecular ya que, permiten manipular y clonar genes provenientes de diferentes fuentes. Es así que con el advenimiento de la era moderna de la biotecnología surgió la clonación del ADN. La palabra clon deriva del griego *Klon* (brote o retoño) y hace referencia a un corte que se utiliza para propagar o copiar una planta. Según una definición biológica moderna, un clon es un organismo generado a partir de células de otro, por lo cual serán individuos genéticamente idénticos. En la naturaleza, un ejemplo son las plantas que se propagan asexualmente y los protozoos (organismos unicelulares que se reproducen por mitosis) (Steinborn y Schinog, 2003).

Un hito importante de la clonación fue la creación de la “oveja Dolly”. Dolly fue creada en el Instituto Roslin de Escocia en julio de 1996. Como suele ocurrir en la ciencia, el nacimiento del primer animal clonado a partir de una célula adulta no fue casual, sino fruto del trabajo de decenas de investigadores a lo largo de los años. Dolly se creó mediante **transferencia nuclear** (Figura 6). A grandes rasgos, esta técnica tiene dos pasos:

1) se toma un óvulo no fecundado y se le extrae el núcleo (enucleación), donde se encuentra el material hereditario.

2) se toma el núcleo de otra célula y se introduce en el óvulo enucleado. Esta nueva célula contiene el potencial de un óvulo fecundado para generar un nuevo individuo, pero las instrucciones de la célula donante.

La clave fue que el núcleo que se utilizó era el de una célula adulta (concretamente, de una célula de glándula mamaria), lo que se pensaba que no era posible ya que se trataba de una célula diferenciada. La introducción del núcleo adulto en el óvulo enucleado y su activación posterior, de algún modo reprogramaron el material hereditario para que dejara de comportarse como el de una célula adulta y pasara a comportarse como el de una célula con capacidad para generar un individuo nuevo.

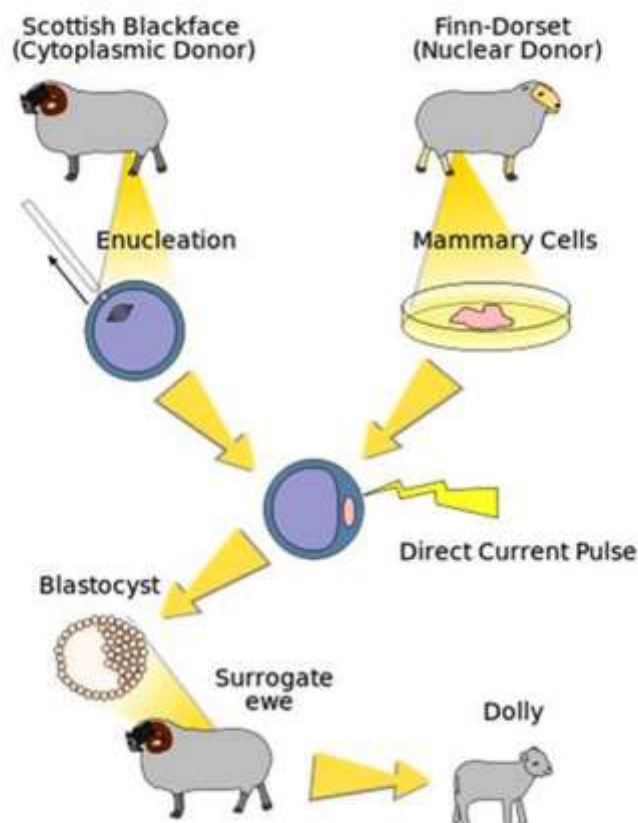


Figura 6. Proceso de clonación para la obtención de Dolly. De: <https://genotopia.com/la-extraordinaria-oveja-dolly/>

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fue desarrollada en 1985 por Kary Mullis. Es una técnica revolucionaria que ha tenido gran impacto en muchas áreas de la biología molecular. En 1993, Mullis ganó el Premio Nobel de Química por su invento.

Esta técnica consiste en una reacción enzimática que amplifica millones de copias de una secuencia específica del ADN en un corto período de tiempo. Para ello, la reacción aprovecha la actividad de la enzima **ADN polimerasa** que tiene la capacidad de sintetizar naturalmente el ADN en las células. La PCR se basa en la repetición de varios ciclos de reacción y los elementos importantes que intervienen son: una cadena molde (ADN o ADNc¹), una enzima (ADN polimerasa), cebadores o primers (secuencias conocidas cortas de ADN diseñadas específicamente para cada reacción), desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs: adenina, timina, citosina y guanina), ion magnesio (Mg⁺), una solución amortiguadora o buffer y H₂O. Todos estos elementos interactúan en tres etapas principales de las que se compone la PCR. Los equipos en donde se realiza la reacción son llamados termocicladores, los cuales están diseñados para establecer un sistema homogéneo en donde

¹ ADNc. Abreviatura de ADN copia o ADN complementario. Es un ADN sintético que se transcribe a partir de un ARNm específico mediante una reacción que utiliza la enzima transcriptasa inversa (<https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/ADN-copia>).

las condiciones de temperatura y tiempo necesarios no se modifiquen en cada uno de los ciclos.

Las etapas de la PCR son las siguientes (Figura 7):

1- **Desnaturalización** del ADN doble cadena: la doble hélice de ADN se separa en dos hebras. Para ello se realiza una incubación de la muestra a altas temperaturas (90-100°C).

2- **Hibridación**: los cebadores se unen a las zonas 3' complementarias que flanquean el fragmento que queremos amplificar. Se realiza mediante una rápida disminución de la temperatura (30-65°C).

3- **Extensión** del cebador por actuación de la ADN polimerasa: se produce la síntesis de la cadena complementaria en la dirección 5' a 3' mediante la enzima ADN polimerasa, la cual incorpora los desoxinucleótidos fosfato presentes en el medio siguiendo la cadena molde (72°C).

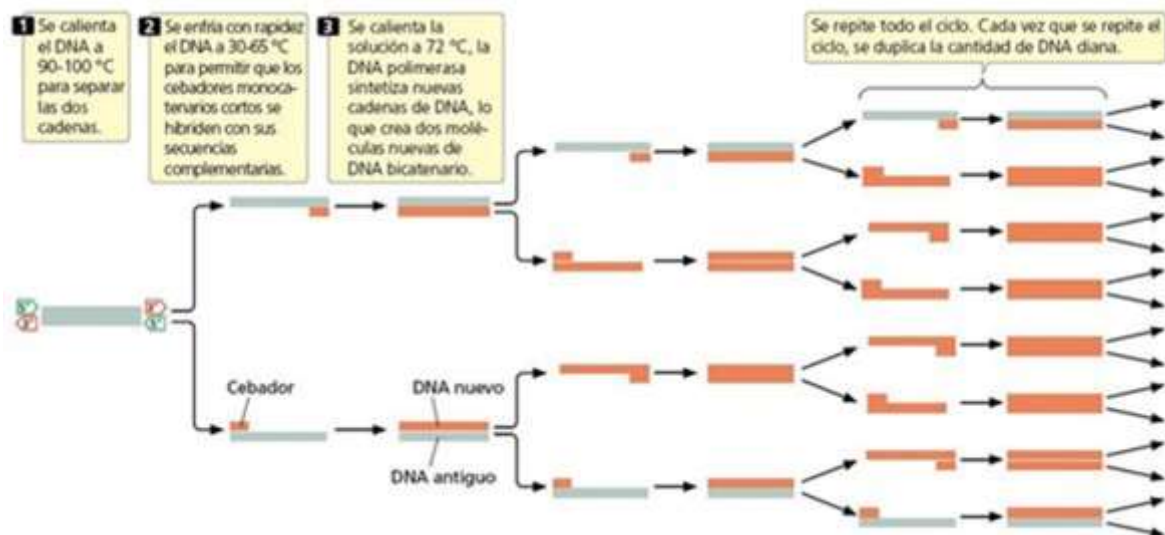


Figura 7. Pasos de un ciclo de la reacción en cadena de la Polimerasa (PCR). Tomado de *Genética: un enfoque conceptual*, 5ª ed., (p. 547), por Pierce, 2015, Medica Panamericana.

Como se muestra en la Figura 7, observamos que una vez completado el primer ciclo, disponemos de dos copias de la muestra original, al final del segundo ciclo tenemos cuatro, al final del tercero ocho, etc. Si los ciclos se producen un número "n" de veces y, suponiendo que el número de copias de ADN se duplica en cada ciclo, obtenemos una cantidad de ADN de 2^n , por lo que la amplificación se realiza en forma de progresión geométrica a partir de un fragmento pequeño de ADN.

Al final de la PCR, para saber si la reacción transcurrió eficientemente, los fragmentos amplificados son visualizados a través de una técnica denominada **Electroforesis** en geles de agarosa. La electroforesis consiste en la separación de grandes moléculas como los ácidos nucleicos a través de una matriz sólida que funciona como un filtro para separar las moléculas en un campo eléctrico de acuerdo a su tamaño y carga eléctrica. Esta separación se hace bajo un buffer o tampón que puede ser TAE² o TBE. En el caso de los ácidos

² El Tris acetato EDTA (TAE) y el tris borato EDTA (TBE) son los dos tampones de migración más comunes utilizados en la electroforesis de los ácidos nucleicos. Como amortiguadores, tienen un pH bastante

nucleicos, el grupo fosfato les proporciona la carga negativa, por lo que durante la electroforesis migran hacia el polo positivo. Los fragmentos más pequeños se desplazan con mayor rapidez mientras que los de mayor tamaño tardan más en desplazarse, por lo que la distancia que recorre cada fragmento es un indicador de su tamaño. Para ello, se prepara un gel diluyendo una cantidad de agarosa en polvo en el buffer, se calienta hasta que la agarosa hierva y se disuelva completamente, y posteriormente se vacía a un recipiente que sirve de base para que solidifique (Figura 8). La posterior visualización se puede realizar tiñendo el ADN con bromuro de etidio (método que actualmente no se utiliza por ser altamente tóxico), *Gel Red* o *Gel Green* y visualizando bajo lámpara de luz UV.

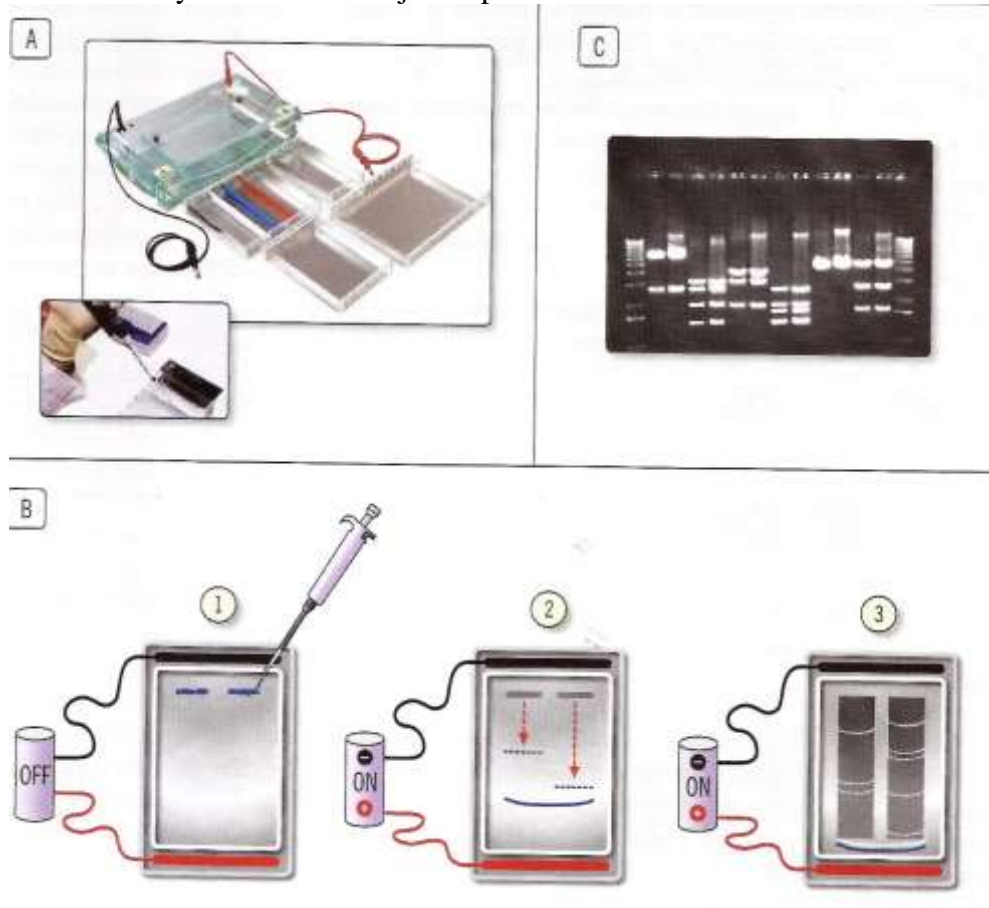


Figura 8. Visualización de fragmentos de ADN mediante electroforesis en gel de agarosa. (A) Cubeta de electroforesis y carga de un gel. (B) Proceso de electroforesis: 1) carga de los pocillos; 2) desplazamiento del ADN en respuesta a una corriente eléctrica; 3) fragmentos distribuidos por tamaño. (C) Visualización de los fragmentos de ADN bajo luz ultravioleta. Tomado de *Genética. Conceptos esenciales* (p. 401), por Benito C., Espino Nuño F.J., 2012, Médica Panamericana.

constante y son capaces de conducir la electricidad debido a su concentración de iones hidrógeno. Estas propiedades son necesarias para la electroforesis en gel durante la cual las proteínas se separan por carga eléctrica (<https://www.sigmaaldrich.com/AR/es/technical-documents/protocol/protein-biology/gel-electrophoresis/tae-and-tbe-running-buffers-recipe>).

Aplicaciones de la biotecnología

Biotecnología microbiana

Las **enzimas microbianas** se han utilizado en aplicaciones que van desde la producción de alimentos hasta la investigación en biología molecular. Dado que los microbios son una fuente de enzimas excelente y útil, algunas de las primeras enzimas disponibles en comercios aisladas para su uso en biología molecular fueron las polimerasas de ADN y las enzimas de restricción procedentes de las bacterias. Aisladas en un primer momento a partir de *E. coli*, estas enzimas se utilizan en técnicas con ADN recombinante como se vio anteriormente (Thieman y Palladino, 2010).

Biotecnología vegetal

El mejoramiento genético de plantas es una de las hazañas más antiguas del hombre, que inició con la domesticación de las mismas bajo condiciones controladas y la selección de aquellas capaces de proporcionar una mejor fuente de alimentos y fibra. Esto marcó una de las fases más importantes en el progreso de la humanidad, al permitirle transitar de una vida nómada e individualista a una sociedad organizada y cooperativista. El proceso de domesticación y posterior mejoramiento genético fue fortuito y lento, más un arte que una ciencia hasta principios del siglo XX.

Un ejemplo es el **Maíz Bt**, un maíz transgénico que produce una proteína bacteriana que mata orugas. Surgió en la década de 1990 en la búsqueda de proteger plantas cultivadas como el maíz, algodón, soja, papa y tabaco de los insectos que se alimentan de ellas. Se sabe que la bacteria *Bacillus thuringiensis* produce unas proteínas tipo “Cry”, consideradas tóxicas para numerosos insectos. Mediante ingeniería genética se introdujo el gen de la proteína Cry en el maíz y, como consecuencia, cuando las larvas de lepidópteros se alimentan de la hoja o del tallo mueren (Reséndiz *et al.*, 2006; Pierce, 2015, Abbas, 2018). Similares procedimientos se realizaron en algodón y soja.

Marcadores moleculares

Un marcador molecular es una secuencia identificable de ADN, que se encuentra en una localización específica del genoma. Estas secuencias se pueden detectar con técnicas colorimétricas, detectores UV, láser, etc. (Semagn *et al.*, 2006)

A lo largo de la historia, la selección de caracteres con utilidad agronómica ha involucrado el uso de diversos marcadores genéticos, entre los cuales se encuentran los morfológicos (características visibles), citogenéticos (variaciones en los cromosomas), bioquímicos (isoenzimas) y moleculares (ADN).

Los marcadores moleculares están vinculados a un gen, son observables sin importar el estado de desarrollo del individuo ni el tejido analizado, ya que la información genética está presente en todas las células.

Las tecnologías de marcadores moleculares son el medio más avanzado y, posiblemente, el más eficaz para entender los fundamentos de la diversidad genética. Son herramientas exactas y poderosas para el viejo arte de la selección, con las cuales se puede identificar y evaluar la variación genética de manera rápida en microorganismos, plantas y animales (Cornide Hernández *et al.*, 2002).

Actualmente, pueden detectarse variaciones ínfimas en el material genético resultando de gran utilidad en genética tanto de microorganismos, de vegetales y de animales. Es así que el desarrollo actual de una gran variedad de sistemas de marcadores moleculares, la diversificación de su uso y su impacto en la agricultura, la medicina y los procesos industriales, hace que se esté convirtiendo en una disciplina caracterizada por la generación de grandes volúmenes de información.

Tipos de marcadores moleculares

RFLP (Polimorfismo en el tamaño de los fragmentos de restricción)

Esta técnica se basa en la detección de fragmentos de ADN de distinto peso molecular (obtenidos mediante el corte con la misma enzima de restricción) en diferentes organismos. El fragmento amplificado que se obtiene por PCR es sometido a la acción de una enzima de restricción específica. Esta enzima corta cuando reconoce secuencias específicas en el ADN amplificado, pudiendo generar fragmentos de distintas longitudes. Luego, los distintos fragmentos de restricción se evidenciarán mediante electroforesis en geles. Por ejemplo, si un organismo no tiene el sitio donde corta la enzima se verá una única banda, mientras que en los que sí tienen ese sitio, se verán dos o más bandas. Otros sistemas de mayor complejidad están representados por el uso combinado de más de una enzima en la determinación de las variantes alélicas para un marcador.

RAPD (ADN polimórfico amplificado al azar)

Es una de las técnicas más versátiles. Se usa para amplificar por PCR áreas específicas distribuidas al azar por el genoma. Su pequeñez y la baja temperatura de alineamiento (36°C) aseguran que se unan a infinidad de secuencias en el genoma para conseguir amplificar muchos fragmentos de ADN. Estos fragmentos se pueden separar en geles de agarosa para obtener perfiles electroforéticos que variarán según el polimorfismo de los distintos individuos o grupos de individuos, y proporcionarán una marca característica. Esta tecnología ha sido utilizada para la catalogación de frutos, selección de variedades, y diferenciación de líneas clonales. También se está utilizando para el análisis de las variedades de apio, uva, limón y numerosos cultivos (Semagn *et al.* 2006, Amom y Nongdam, 2017).

AFLP (Polimorfismo de la longitud de los fragmentos amplificados)

Esta técnica combina el uso de enzimas de restricción y cebadores o primers para PCR, de manera que se obtienen marcadores moleculares muy específicos sin necesidad de conocer la secuencia con anterioridad. Esta técnica ya se ha usado con éxito en papa, caña de azúcar, cebada, etc.

SSR (Secuencias de Repetición Simple) o "microsatélites"

Se trata de marcadores que permiten averiguar diferencias genéticas entre individuos de una misma raza o con mezcla de las mismas, realizar estudios poblacionales e investigar parentescos. Son secuencias de dos a cinco nucleótidos repetidas en tándem. La detección de estos involucra la amplificación de cada marcador microsatélite y la posterior diferenciación de las variantes de cada sistema, mediante electroforesis. El número de

repeticiones definirá el largo del fragmento amplificado, determinando su posición en la corrida electroforética (Figura 9).

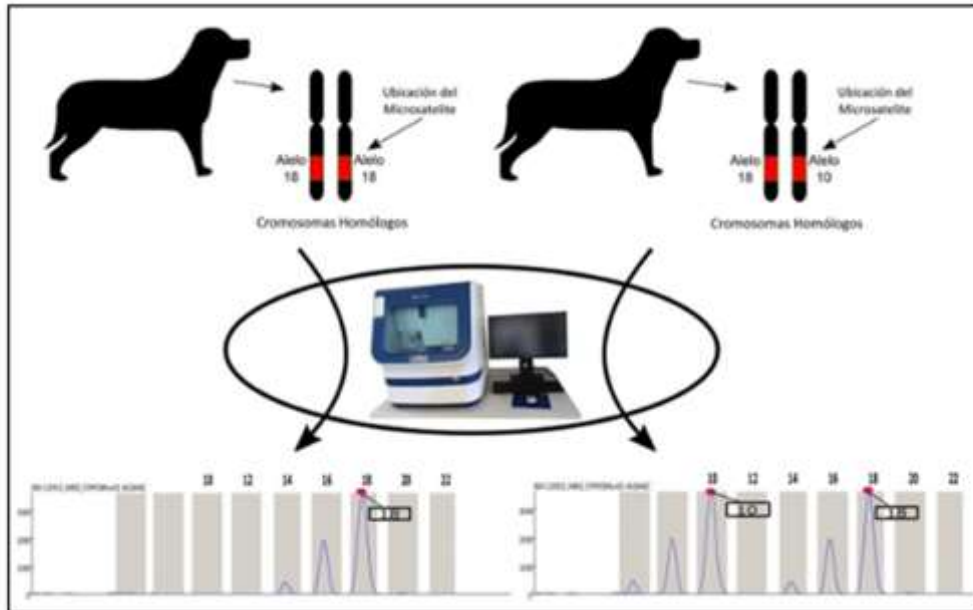


Figura 9. Interpretación de los resultados del análisis de un marcador microsatélite a través de electroforesis capilar, mostrando un electroferograma de un perro homocigota y otro heterocigota. Tomado de: http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/131500/Documento_completo.pdf-PDFA.pdf?sequence=1&disAllowed=y

SNP (polimorfismo de nucleótido simple)

Los cambios en un nucleótido en la secuencia del genoma se conocen como SNPs. Los mismos están basados en la sustitución de nucleótidos que ocurre naturalmente. Los SNPs son abundantes en plantas y animales y la frecuencia en plantas varía entre un SNP cada 100-300 pb (pares de bases). Están ampliamente distribuidos dentro del genoma y pueden encontrarse en regiones codificantes y no codificantes. La identificación se basa en el análisis de secuencias almacenadas en bases de datos (Ej. librerías genómicas). Se pueden utilizar como marcadores para genotipificado mediante técnicas como ser NGS (secuenciación de nueva generación), GBS (genotipificado por secuenciación) y chips (Semagn *et al.* 2006, Amom y Nongdam, 2017).

A continuación, se mencionan algunos ejemplos de usos de marcadores moleculares:

- Diferenciación de individuos
- Discriminación entre clones
- Análisis filogenéticos y taxonómicos
- Mapeo de genomas
- Cuantificación de variabilidad intra e interespecífica
- Mejora genética
- Detección de infecciones o propensión a sufrirlas
- Localización de resistencia a enfermedades, virus e insectos

- Selección asistida por marcadores

Transgénesis

La transgénesis constituye una parte de la biotecnología que consiste en la introducción artificial de información genética de una especie a otra, para dotarle constitutivamente de unas propiedades de las que carecía y que además sean heredables (World Health Organization, 2016). Al organismo modificado se le denomina *transgénico*, así como a los productos derivados del mismo.

La obtención de un Organismo Genéticamente Modificado (**OGM**) supone la preparación de un transgén, mediante la recombinación de ácidos nucleicos (fundamentalmente ADN) *in vitro*, seguida de su introducción en las células del organismo a modificar.

Plantas transgénicas

La obtención de plantas transgénicas busca la transformación de plantas o variedades cultivadas por la incorporación de uno o más genes que aporten alguna característica nueva o corrijan alguna carencia. Entre sus principales aplicaciones se encuentran: a) aumentar el rendimiento de las cosechas; b) aumentar la tolerancia a los factores abióticos (heladas, sequía), resistencia a los factores bióticos que limitan el crecimiento (plagas y enfermedades); c) aumentar la calidad de sus productos (frutos, semillas); d) mejorar características de procesamiento o almacenamiento del cultivo; e) mejorar la calidad postcosecha (retrasar el envejecimiento de las flores, la maduración del fruto, aumentar la cantidad de azúcares); f) sintetizar productos de interés industrial (aceites, almidón, caucho, celulosa, ceras, plásticos, etc.); g) descontaminar suelos; h) tolerancia a productos químicos (herbicidas).

Un ejemplo importante es el “*Golden rice*” –arroz dorado rico en vitamina A-, obtenido por el investigador suizo Ingo Potrykus en el Instituto de Biología de Plantas (ETH) de la Universidad de Zúrich (Beyer *et al.*, 2002, Pierce, 2015). Este arroz es una variedad transgénica portadora de un precursor de la Vitamina A, diseñado para erradicar una avitaminosis endémica en muchas regiones en que se cultiva este cereal y donde más de dos millones de niños padecen ceguera e incluso la muerte. La FAO recomienda su utilización para ayudar en la lucha contra la desnutrición por esta enfermedad (<https://www.argenbio.org/biotecnologia/153-6-las-plantas-transgenicas>).

Hoy en día, los principales cultivos transgénicos sembrados en Argentina son soja, maíz y algodón con distintas combinaciones de tolerancia a herbicidas y resistencia a insectos. En la Figura 10 puede verse el área global por países con cultivos de OGM (<https://www.argenbio.org/recursos/66-estadisticas/206-area-global-gm>).

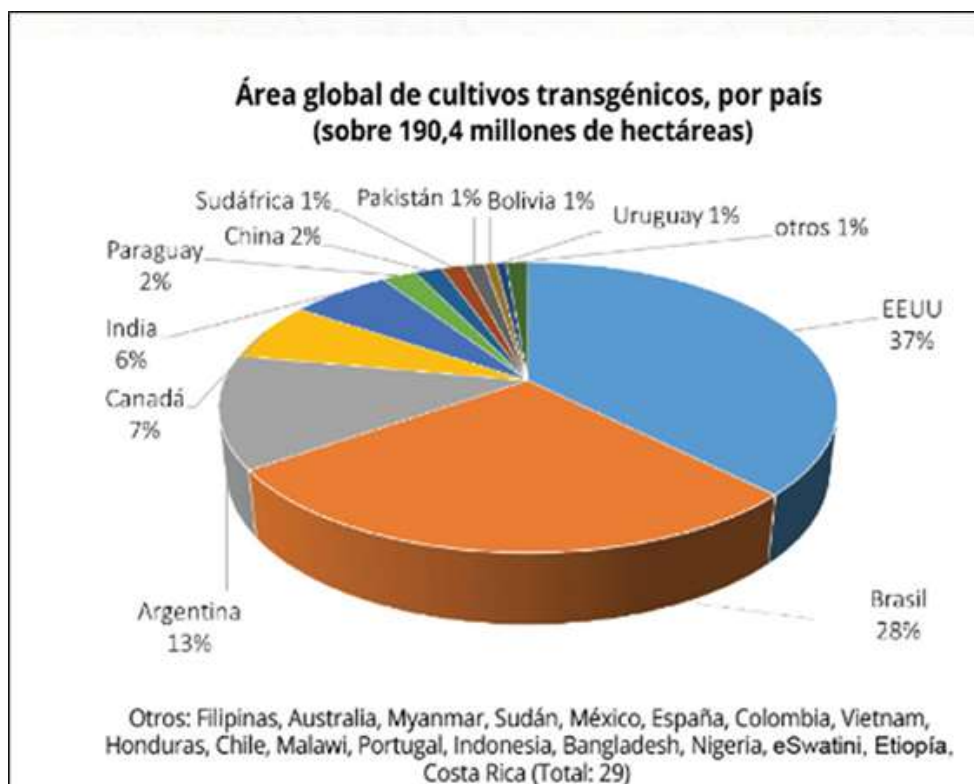


Figura 10. Área global de cultivos transgénicos por país. Tomado de: ISAAA, 2019.

Animales transgénicos

La ingeniería genética permite modificar genéticamente animales, con objetivos que van desde el mejoramiento de las razas domésticas hasta el empleo de los animales como fábricas de fármacos. La modificación genética se puede realizar ya sea, anulando o alterando ciertos genes presentes en un animal, o bien transfiriendo genes a un animal desde la misma especie o de una especie diferente.

Existen en la actualidad cabras transgénicas que generan una **proteína anticoagulante** en sus ubres: este producto es el primer medicamento producido en animales transgénicos y ya está aprobado por las agencias regulatorias de Europa y EEUU. Esta aplicación de la biotecnología se denomina en inglés “molecular pharming”, y consiste en el empleo de los animales como “fábricas de moléculas”(https://www.argenbio.org/biotecnologia/152-5-los-animales-transgenicos).

En relación con la calidad nutricional de la leche, dos instituciones estatales argentinas (INTA y USAM), lograron una ternera de raza Jersey, a la que llamaron *Rosita*, que es el primer clon bovino transgénico obtenido en el país y también el primero en el mundo al cual se le han incorporado dos genes humanos que codifican dos proteínas presentes en la leche humana de alta importancia para la nutrición de los niños lactantes: lisozima y lactoferrina. Con este importante logro, la leche que produzca esta ternera en su vida adulta se asemejará a la leche materna, ya que la leche de vaca casi no contiene lisozima y la actividad de la lactoferrina es específica de cada especie.

Asimismo, se encuentran en etapa experimental el desarrollo de pollos transgénicos (por tecnología de ARN) que no transmitan la gripe aviar, de manera de disminuir no sólo la

enfermedad en los pollos, sino también la posibilidad de que alguna cepa mutante pase la barrera de especie y contagie a humanos, como sucedió con la cepa H1N1.

Consideraciones bioéticas

A pesar de la ausencia de riesgo de la utilización de los OGMs, persisten las dudas y no cesan las campañas de recelo, en particular hacia una agricultura basada en la ingeniería genética. La Administración Alimentaria y de Medicamentos de los Estados Unidos (FDA), ha propuesto una evaluación regulatoria obligatoria para todos los productos alimenticios de origen animal cuyos genomas hayan sido modificados utilizando tecnologías moleculares modernas, incluida la edición de genes, lo que contrasta con la política sobre productos biotecnológicos de los EE.UU. en donde la supervisión regulatoria debe ser desencadenada cuando existe un riesgo razonable. Por ello, en la actualidad en los EE.UU. está en estudio la armonización de las regulaciones asociadas con la edición de genes en especies alimentarias que sean compatibles con el mejoramiento de rasgos útiles de sostenibilidad, como la resistencia a las enfermedades, la adaptabilidad climática y la calidad de los alimentos (Van Eenennaam *et al.*, 2019).

Para poder ser adoptados por los agricultores, los cultivos transgénicos deben tener la aprobación de las autoridades regulatorias correspondientes. En Argentina, la autorización para la comercialización de un cultivo transgénico está a cargo de las autoridades de la Secretaría de Alimentos, Bioeconomía y Desarrollo Regional del Ministerio de Agricultura Ganadería y Pesca, y se basa en los informes técnicos elaborados por tres Direcciones y sus Comisiones Asesoras. Se evalúa que los cultivos transgénicos y sus productos sean seguros para el consumo, tanto humano como animal, y que no tengan un potencial impacto negativo en el ambiente.

Bibliografía

- Abbas, MST. (2018) Cultivos modificados genéticamente (cultivos de *Bacillus thuringiensis*) y la controversia mundial sobre su seguridad. Egypt J Biol Pest Control 28 , 52. <https://doi.org/10.1186/s41938-018-0051-2>.
- Amom T., Nongdam P. (2017). The use of molecular marker methods in plants: a review. International Journal of Current Research and Review, 9(17): 1-7
- Argenbio. (10 de junio de 2023). <https://www.argenbio.org/biotecnologia/152-5-los-animales-transgenicos>.
- Argenbio. (10 de junio de 2023). <https://www.argenbio.org/recursos/66-estadisticas/206-area-global-gm>.
- Argenbio. (15 de junio de 2023). <https://www.argenbio.org/biotecnologia/153-6-las-plantas-transgenicas>.
- Baeshen N.A., Baeshen M.N., Sheikh A., Bora R.S., Ahmed M.M., Ramadan H.A., Saini K.S., Redwan E.M. (2014). Cell factories for insulin production. Microbial Cell Factories, 13(141): 1-9.
- Benito C., Espino Nuño F.J. (2012). Genética. Conceptos esenciales. Madrid: Médica Panamericana.

- Berg J.M., Tymoczko J.L., Stryer L. (2008). Bioquímica, 6ta ed.; Biochemistry, Sixth Edition; Macarulla, J.M. (Trad.); p. 1026. Barcelona, España: Editorial Reverté
- Beyer P., Al-Babili S., Ye X., Lucca P., Schaub P., Welsch R., Potrykus I. (2002). Golden rice: introducing the β -carotene biosynthesis pathway into rice endosperm by genetic engineering to defeat vitamin A deficiency. *The Journal of nutrition*, 132(3): 506-510.
- Cornide Hernández M.T. (2002). Marcadores Moleculares: nuevos horizontes en la genética y la selección de las plantas. Editorial Félix Varela, La Habana.
- ISAAA. International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications. <https://www.isaaa.org/>.
- Loenen W.A.M., Dryden D.T.F., Raleigh E.A., Wilson G.G., Murray N.E. (2014). Highlights of the DNA cutters: a short history of the restriction enzymes. *Nucleic Acids Researc*, 42(1): 3-19.
- Luque J., Herráez A. (2006). Texto ilustrado de Biología Molecular e Ingeniería Genética. Conceptos, Técnicas y Aplicaciones en Ciencias de la Salud. Primera Edición. Ed. Harcourt, S.A. Madrid, España, 132-136 p.
- Muñoz de Malajovich M.A. (2012) Biotecnología. 2^{da} ed. Universidad Nacional de Quilmes Editorial, 448 p.
- Navarro A.R., Maldonado M.C., Rubio M.C. (2005). Biotecnología microbiana. 1^oEd.- Tucumán, 246p. ISBN 987-05-0352-7.
- Pierce B. A. (2015) Genética: un enfoque conceptual, 5^o ed. Madrid, España: Ed. Medica Panamericana.
- Reséndiz R.Z., López S.T.A, Osorio H.E., Estrada D. B., Pecina M. J. A., Mendoza C.M.C., Reyes M.A. (2006). Importancia de la resistencia del maíz nativo al ataque de larvas de lepidópteros. *Temas de Ciencia y Tecnología*. 20. 3-14. https://www.utm.mx/edi_anteriores/temas59/T59_1E1.pdf
- Semagn K., Bjørnstad Å., Ndjiondjop M. N. (2006). An overview of molecular marker methods for plants. *African journal of biotechnology*, 5(25).
- Steinborn R, Schinog P. (2003). Mitochondrial DNA heteroplasmy in cloned cattle produced by fetal and adult cell cloning. *Nature Biotechnology* 18 (8): 505.
- Tecnologías de Marcadores Moleculares para Estudios de Diversidad Genética de Planta. (Consultado: 10 mar 2006). Disponible en: http://www.ipgri.cgiar.org/Training/Unit101/MolMarkers_es/PDF/VOL1/C.Prologo.pdf.
- Thieman W.J., Palladino M.A. (2010). Introducción a la biotecnología. Ed. Pearson educación, s.a. 2010 ISBN: 978-84-7829-117-5.
- Van Eenennaam A.L., Wells K.D., Murray J.D. (2019). Proposed U.S. regulation of gene-edited food animals is not fit for purpose. *Npj Sci Food* 3 (3) <https://doi.org/10.1038/s41538-019-0035-y>

World Health Organization (2016) [publicación en línea] <http://www.hoint/foodsafety/areas-work/foodtechnology/faq-genetically-modified-food/en/>