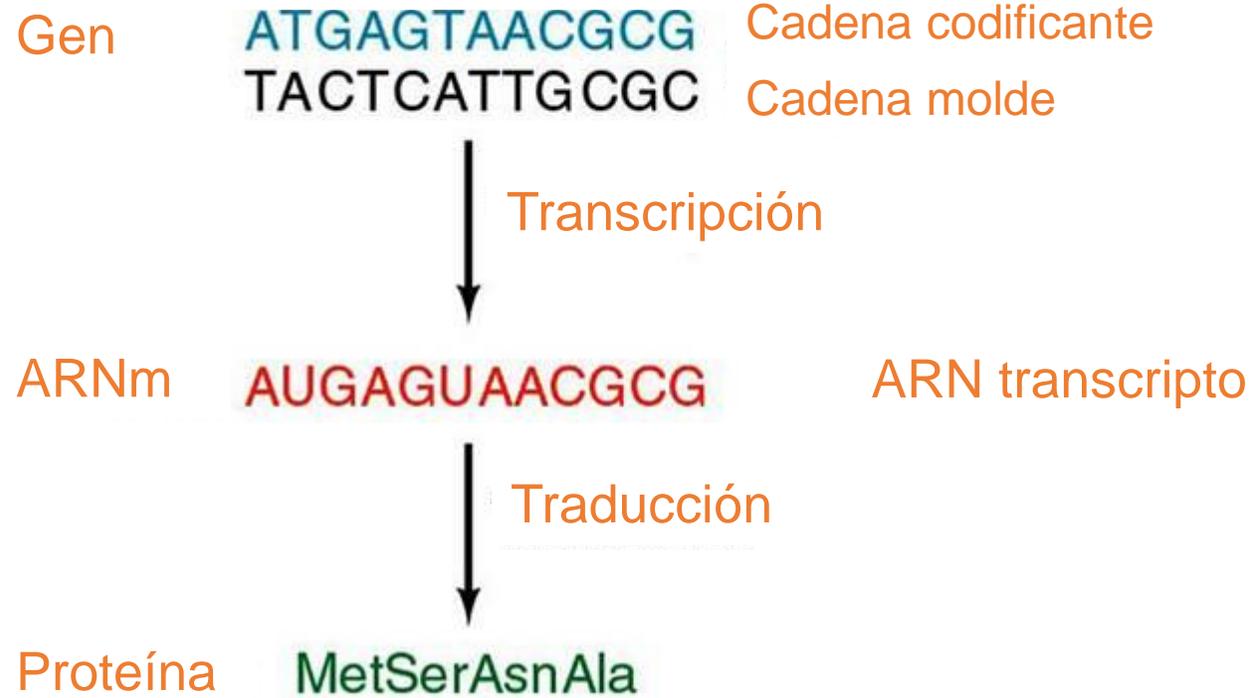
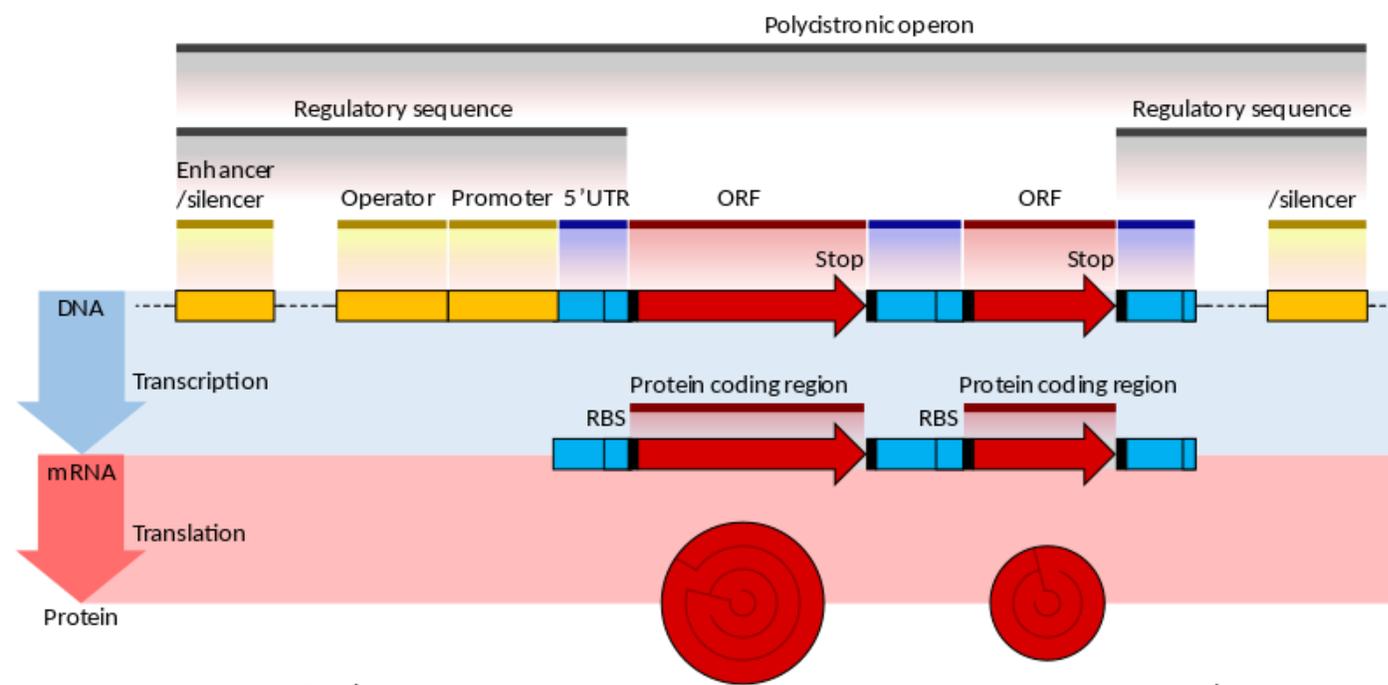


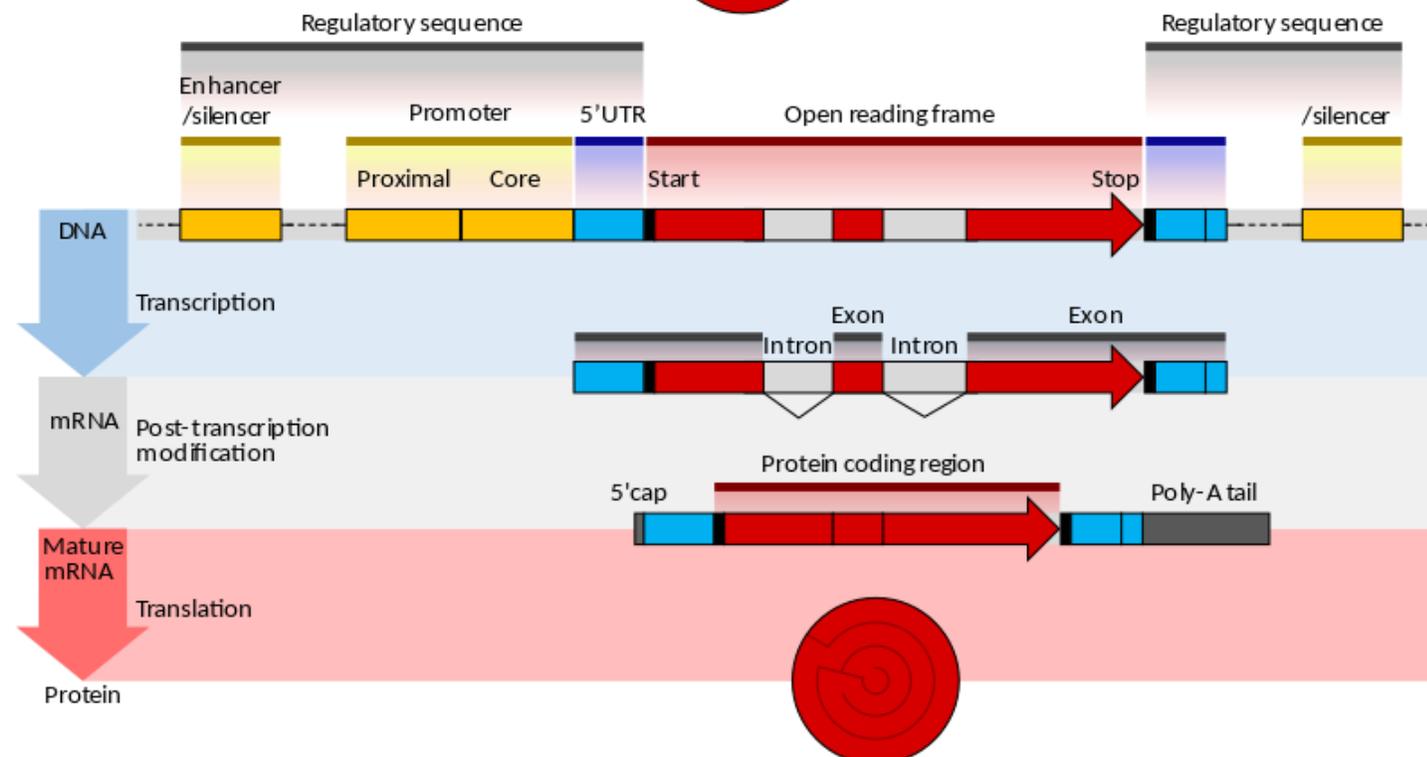
**Genes. Fundamentos.**  
**Regulación de la expresión génica**



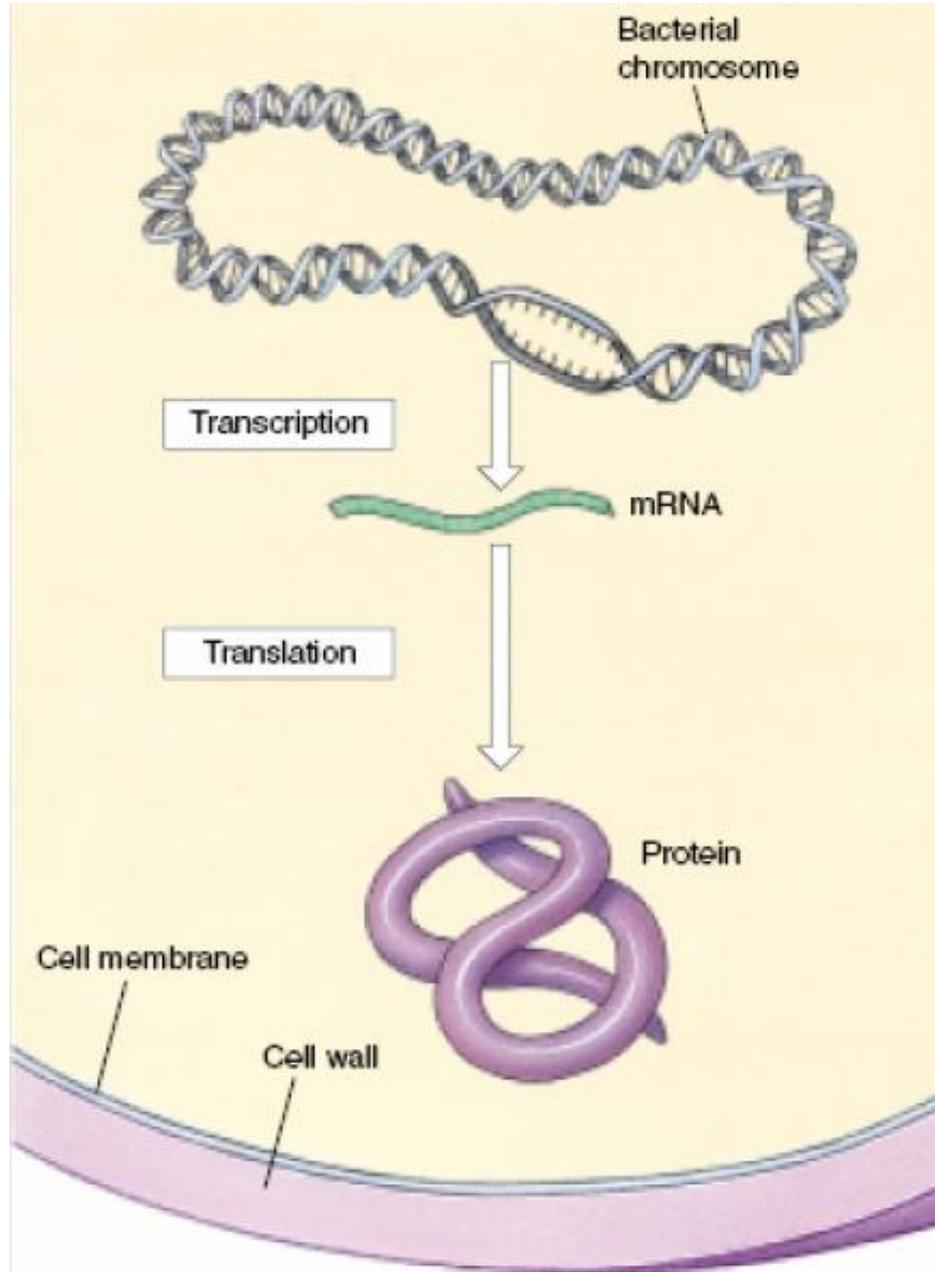
# Procariota



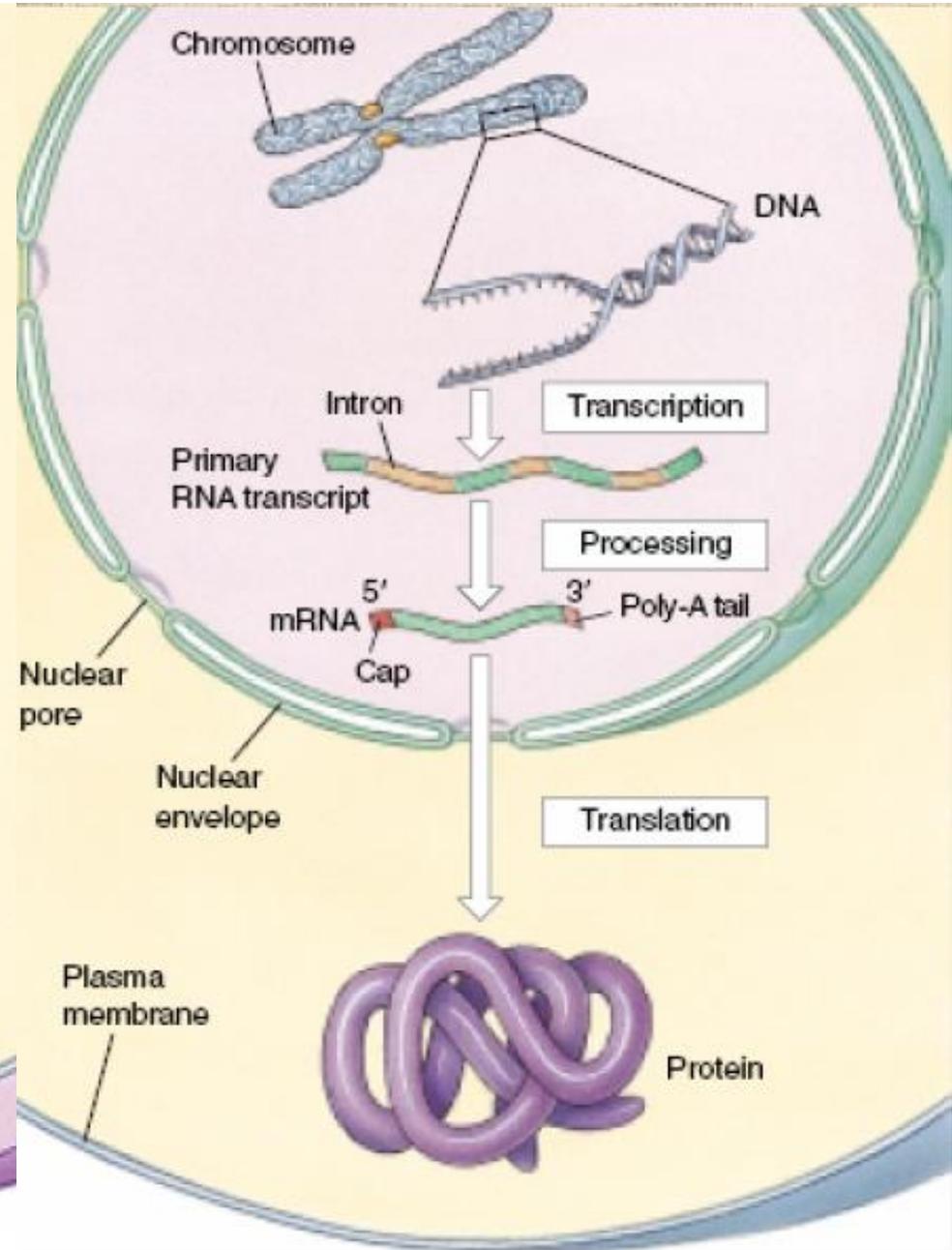
# Eucariota



# Procariotas

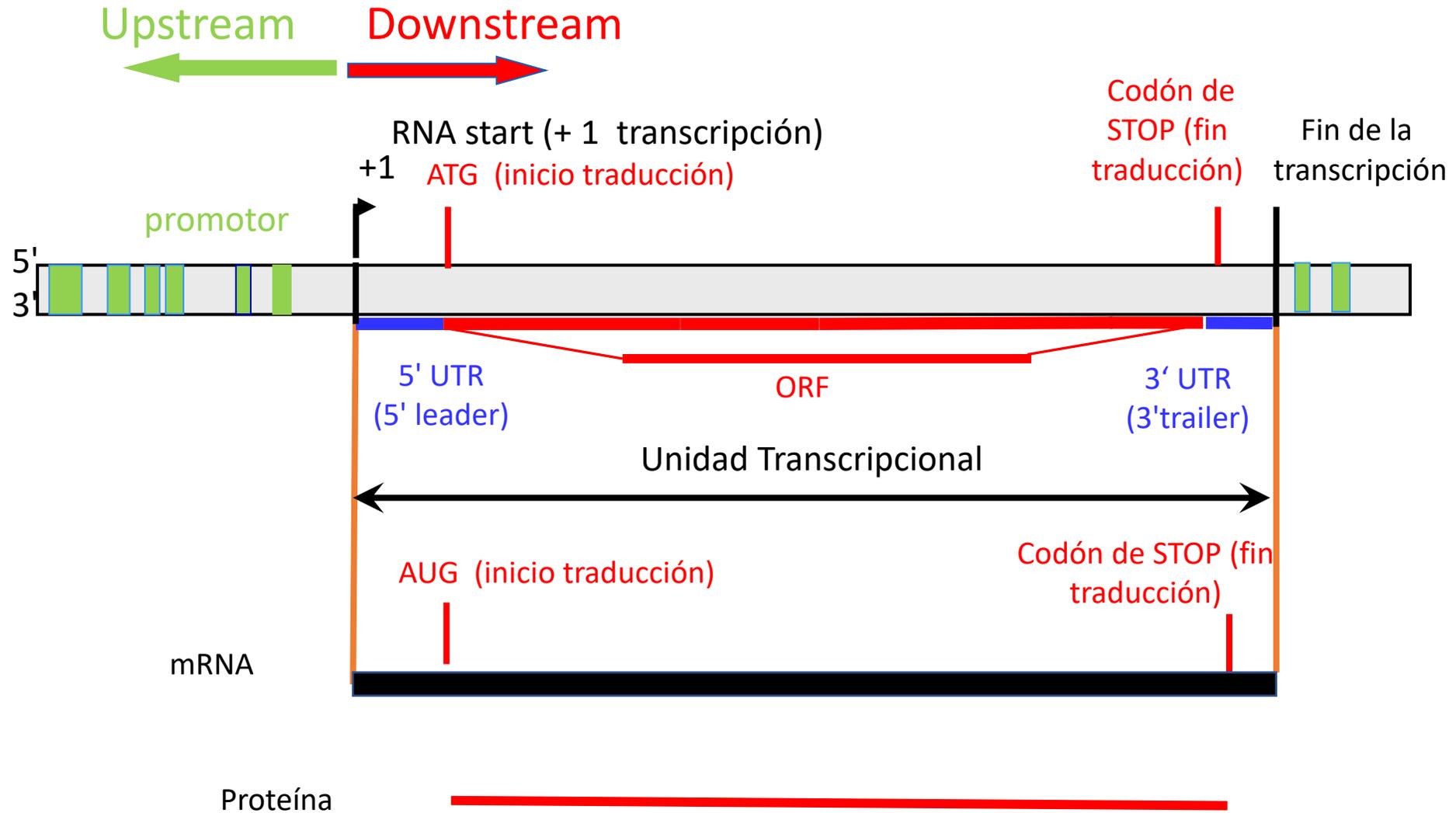


# Eucariotas



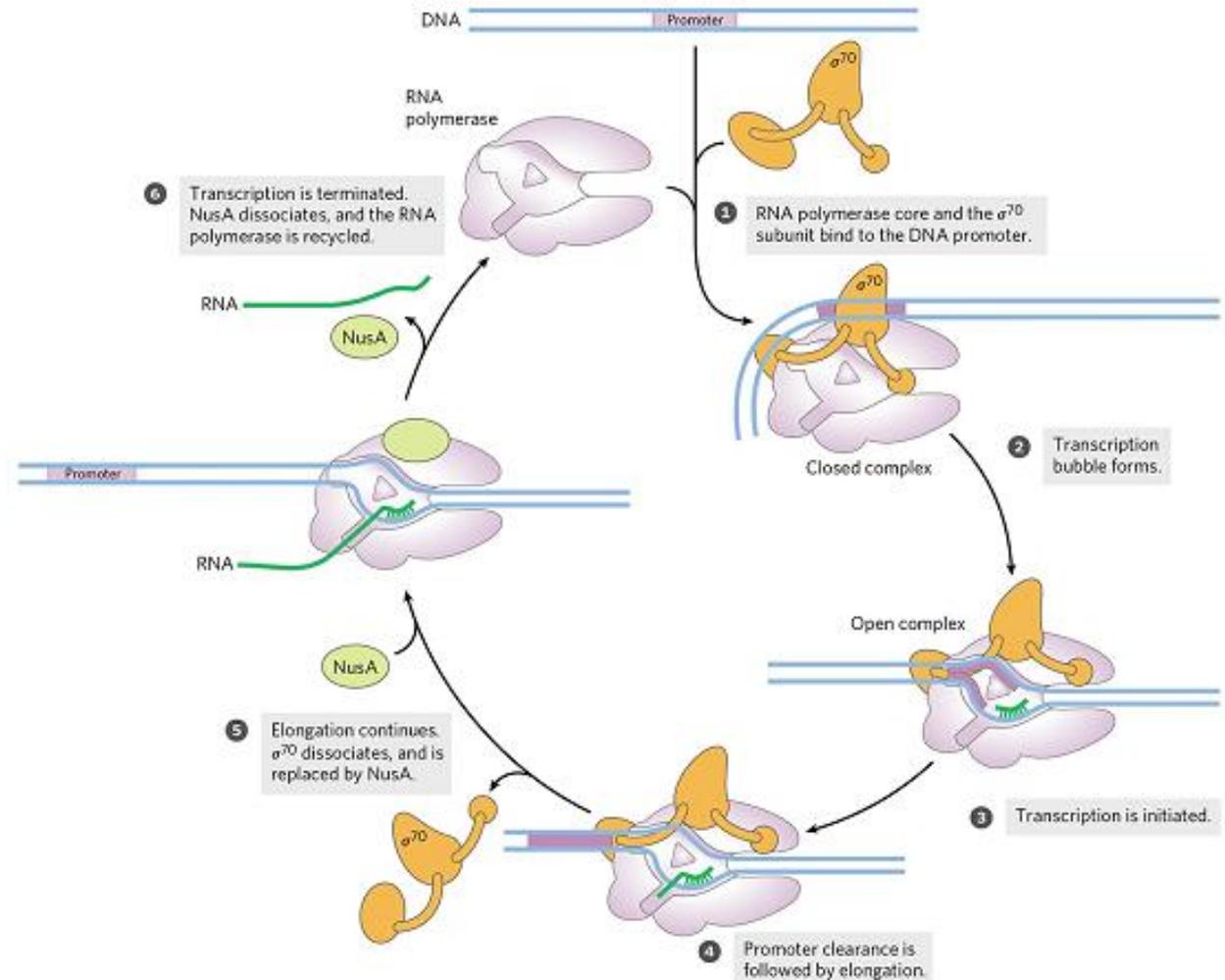
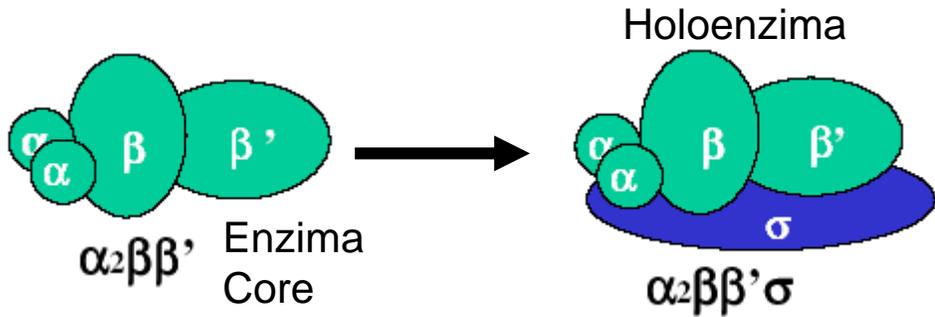
# **Procariotas: Sistemas más simples**

# Estructura de un gen procariota

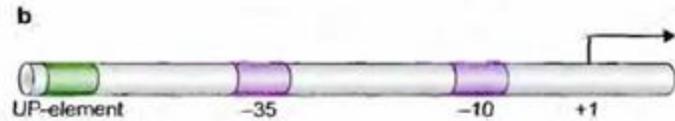
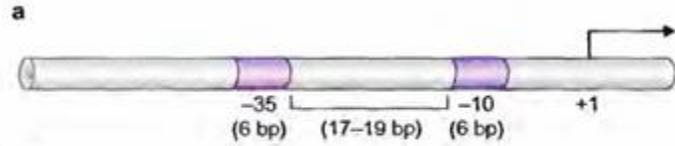
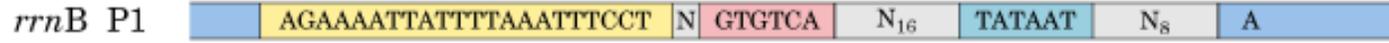
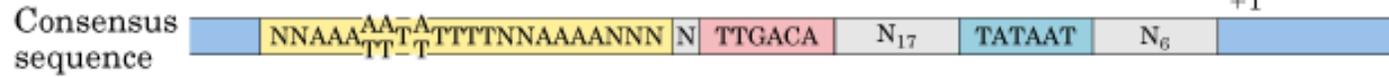


# Las ARN polimerasas

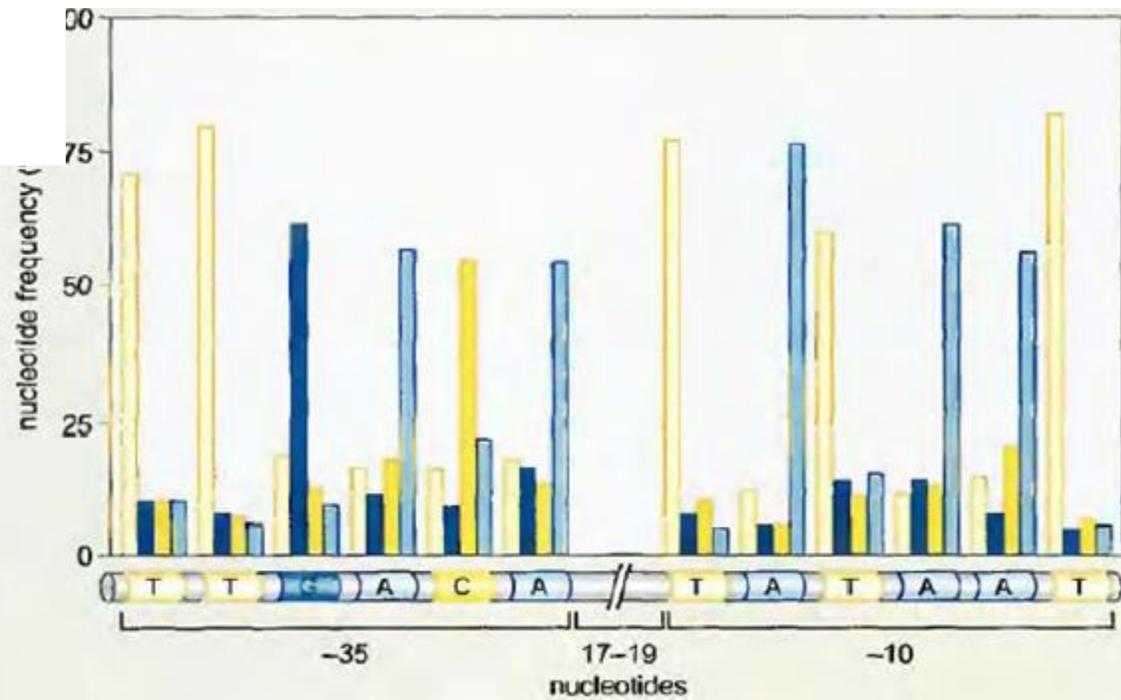
Catalizan la síntesis de todos los tipos de ARN



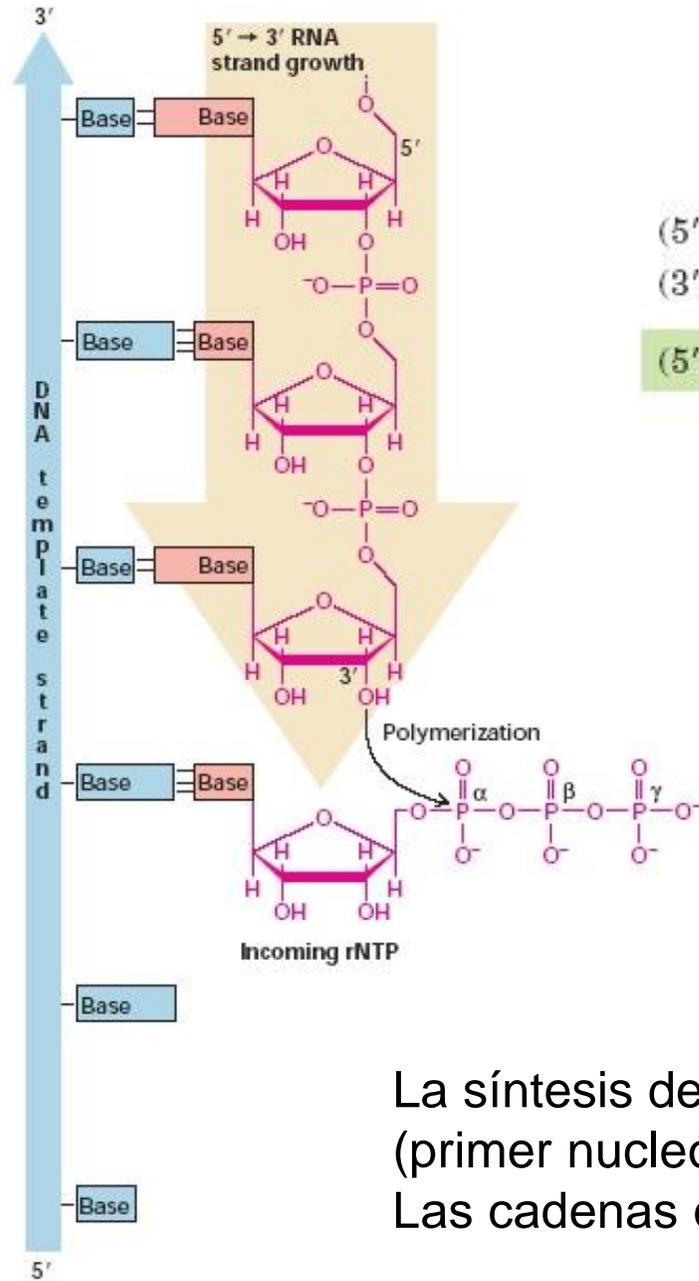
# Secuencias promotoras procariotas



Secuencia consenso  
y espaciamiento



# Síntesis de ARN



(5') CGCTATAGCGTTT (3')

DNA nontemplate (coding) strand

(3') GCGATATCGCAA (5')

DNA template strand

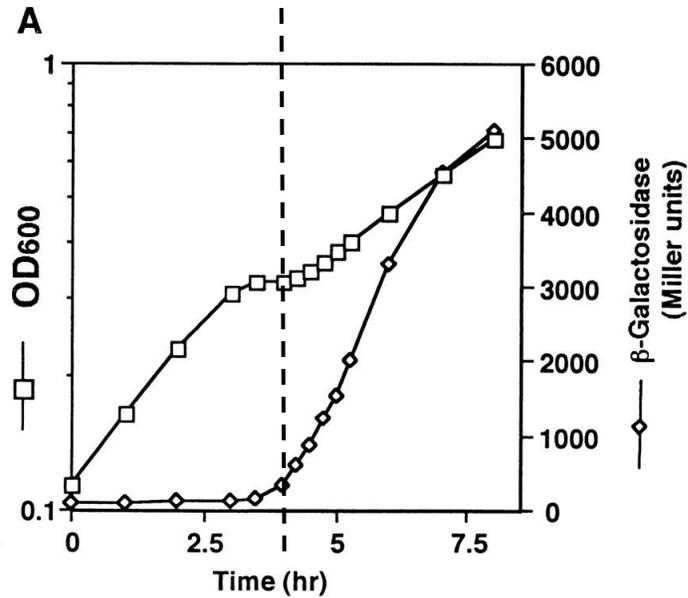
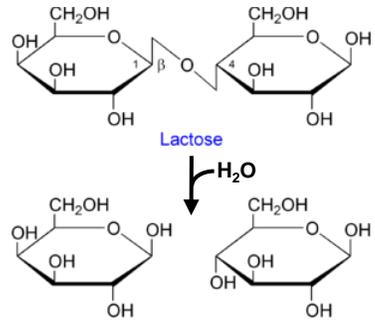
(5') CGCUAUAGCGUUU (3')

RNA transcript

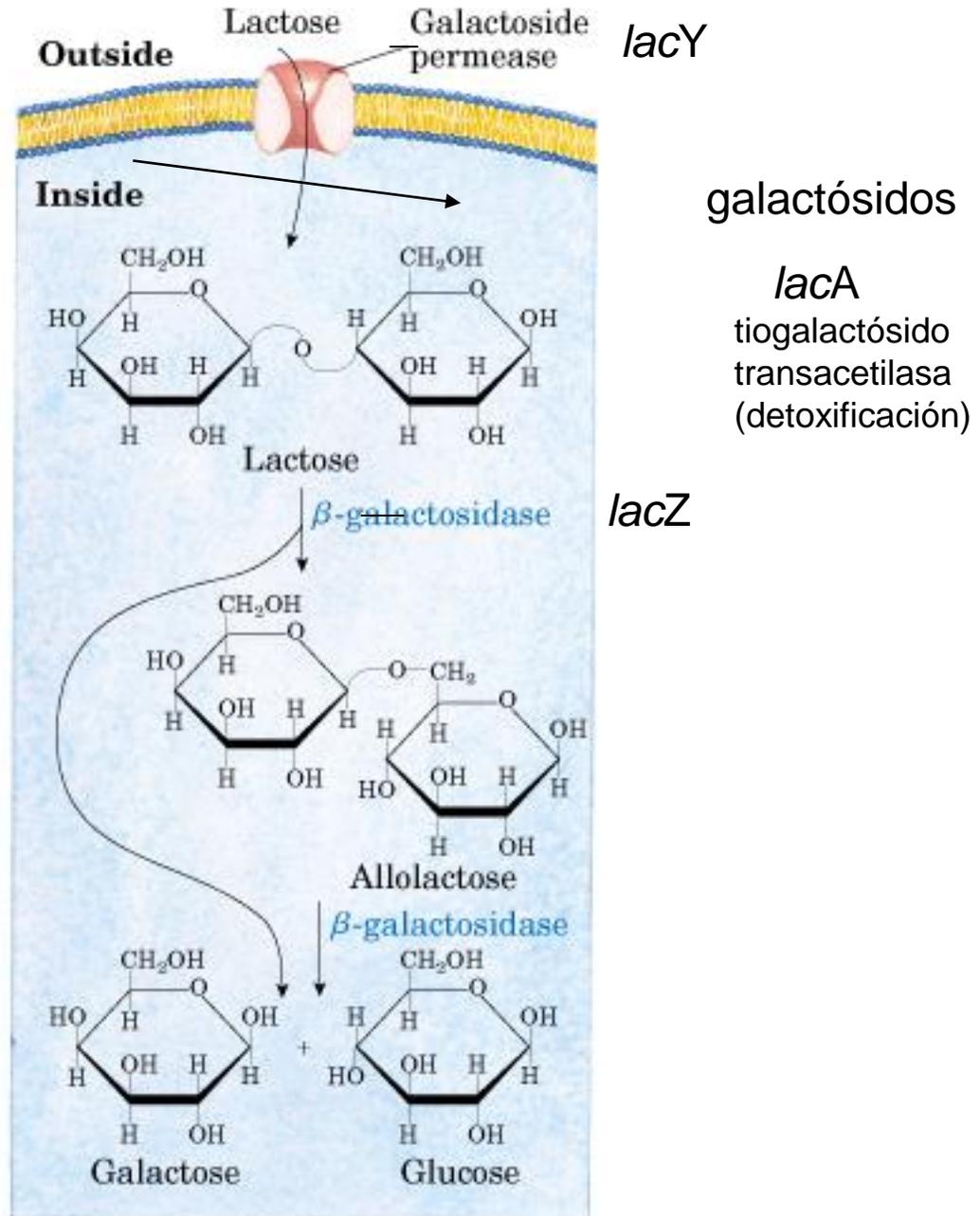
La síntesis de ARN generalmente se inicia con ATP o GTP (primer nucleótido)

Las cadenas de ARN son sintetizadas de 5' a 3'

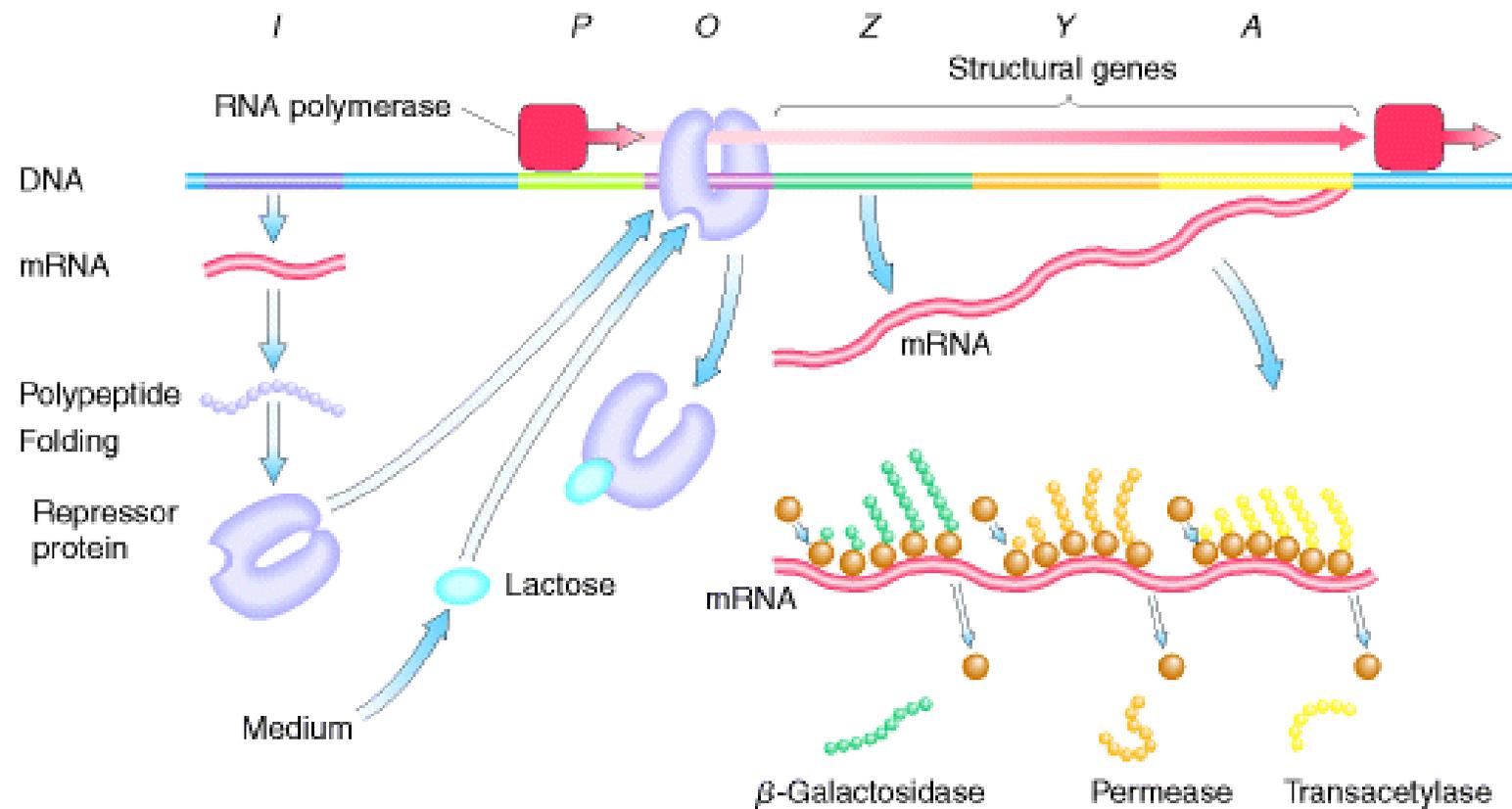
## Creciendo diáuxico



*Escherichia coli* creciendo en un medio que tiene glucosa y lactosa como fuentes de carbono y energía

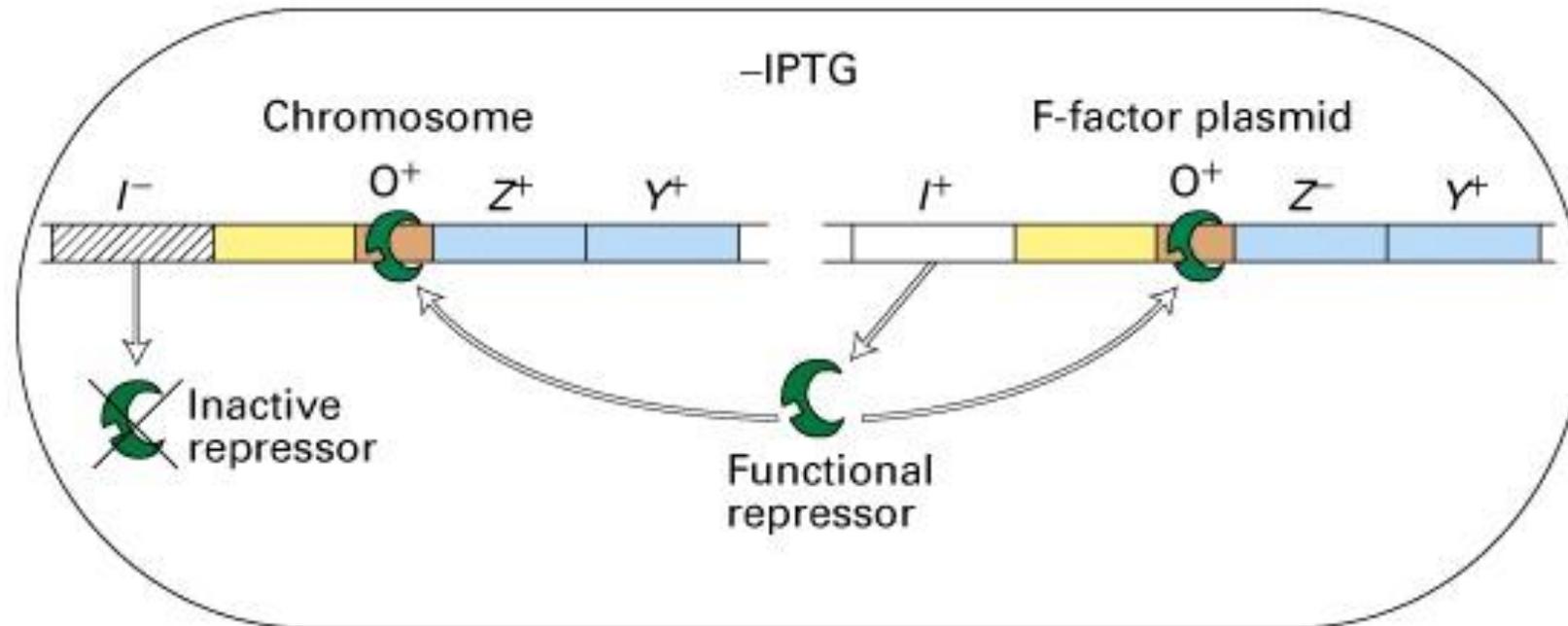
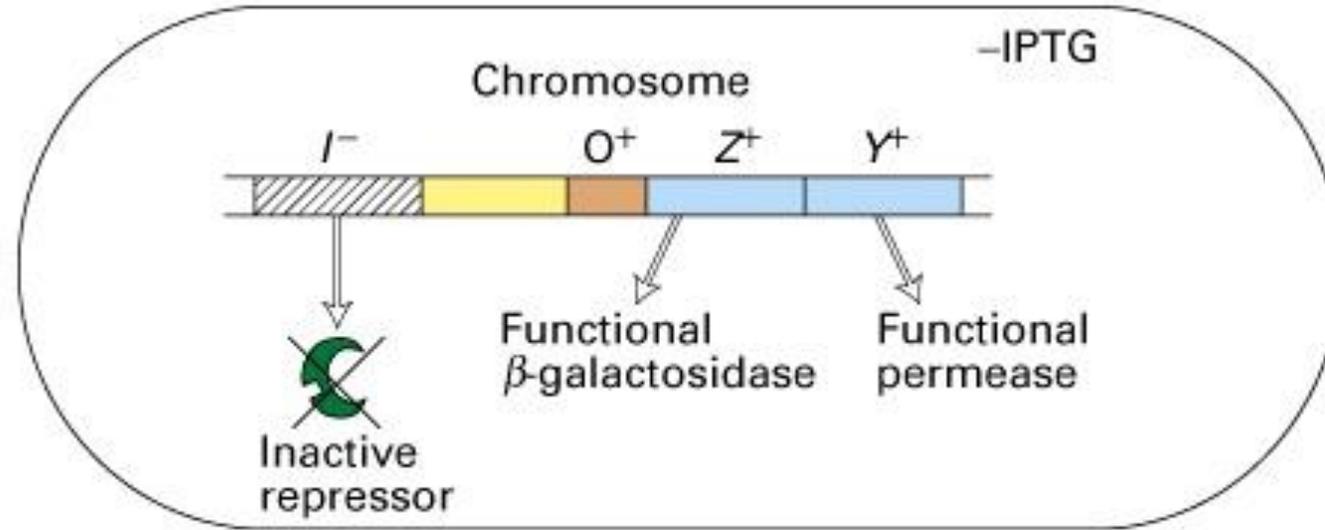


# Operón *lac*: regulación negativa

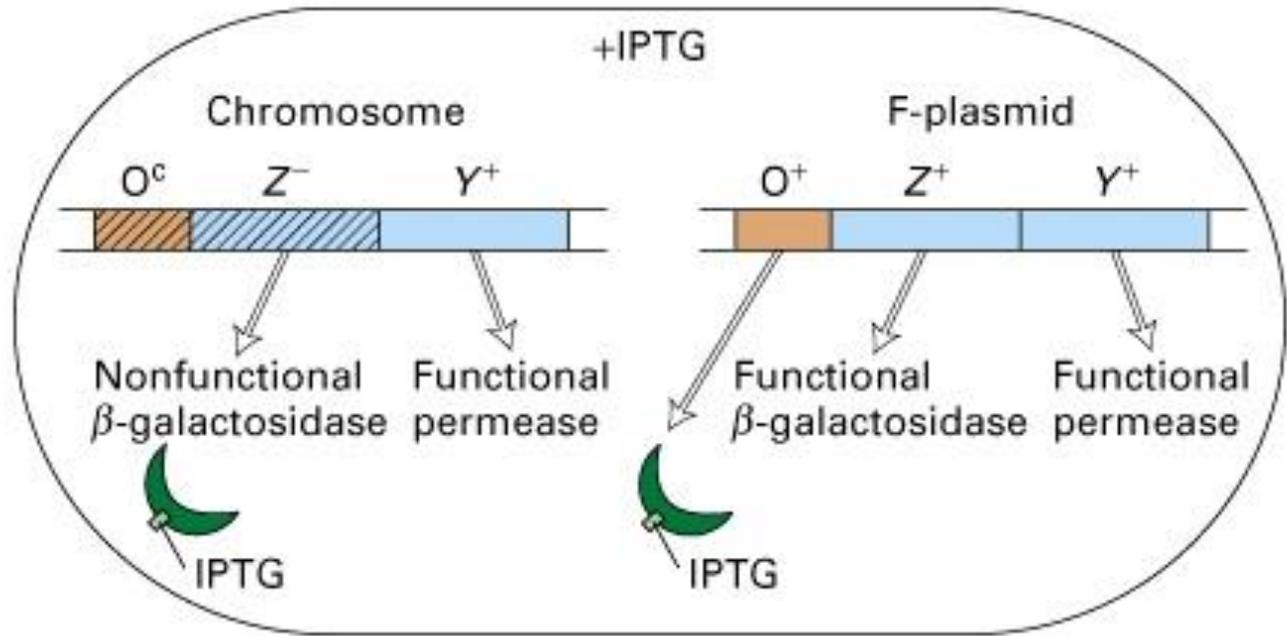
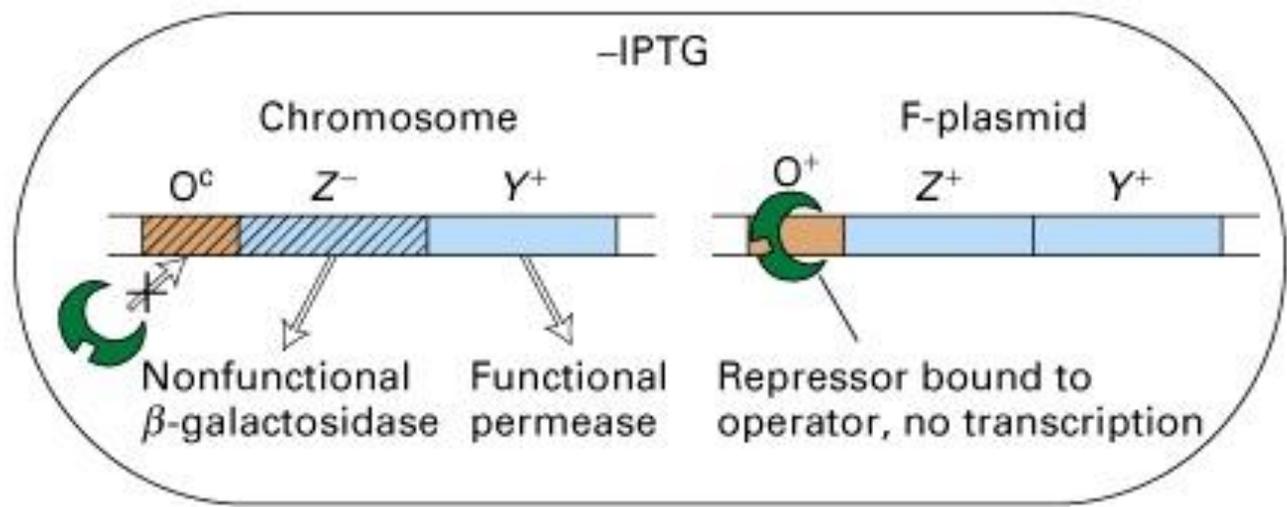


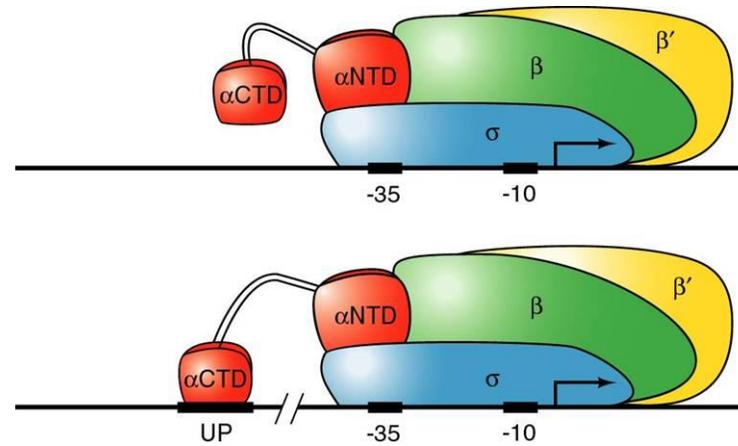
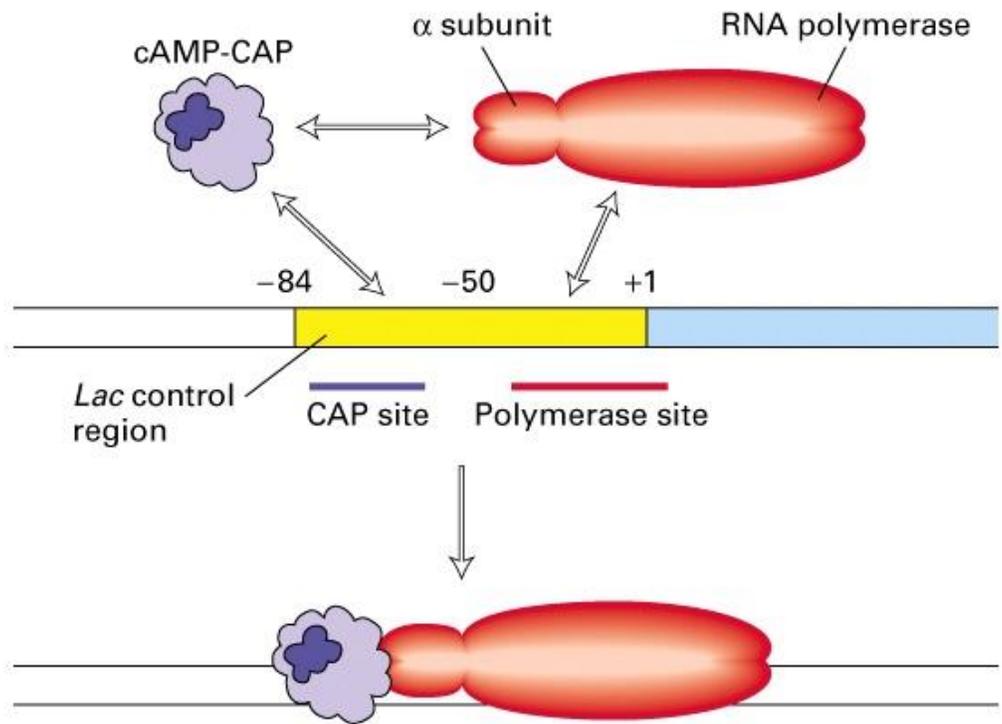
- ***lacZ*** codifica para la  $\beta$ -galactosidasa
- ***lacY*** codifica para la  $\beta$ -galactosidasa permeasa
- ***lac A*** codifica para la  $\beta$ -galactosidasa transacetilase,

# Factores que actúan en *trans*

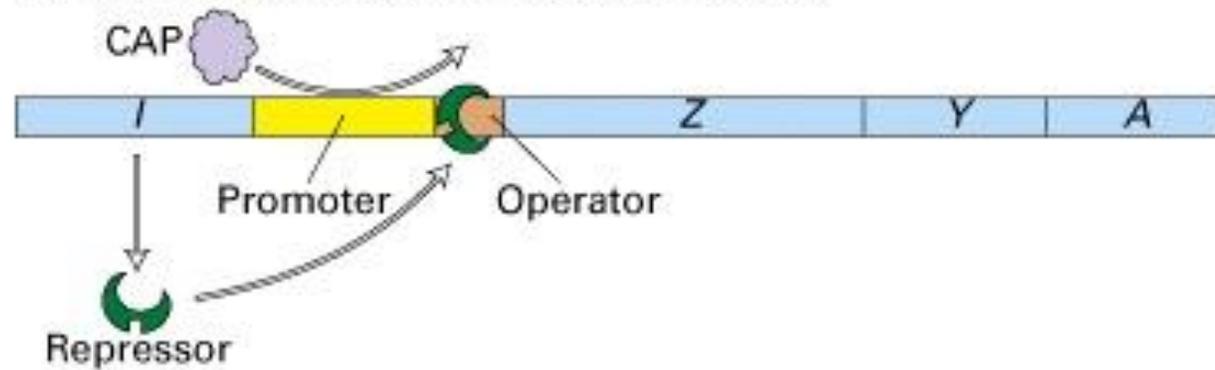


# Secuencias que actúan en *cis*

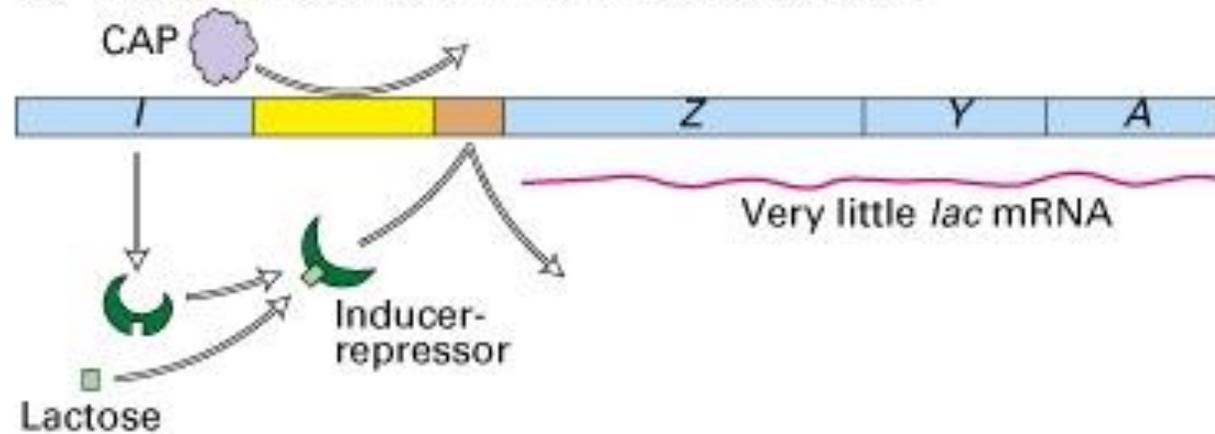




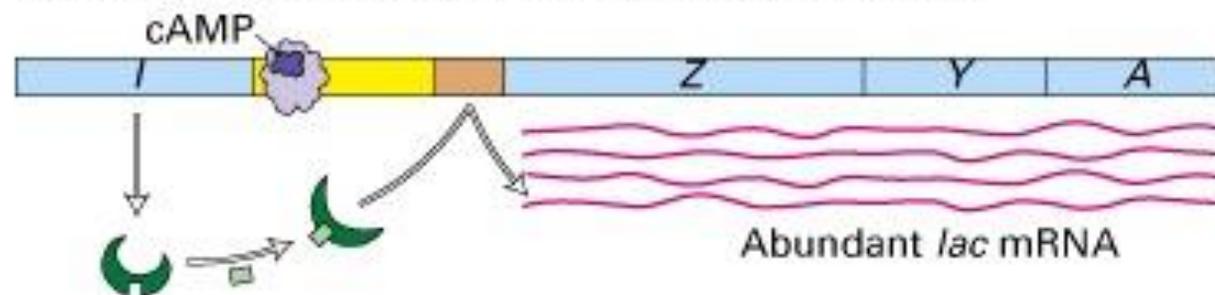
(a) Glucose present (cAMP low); no lactose

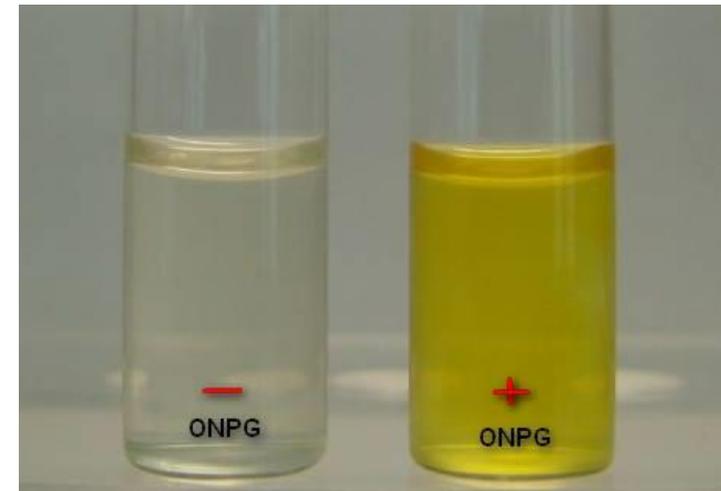
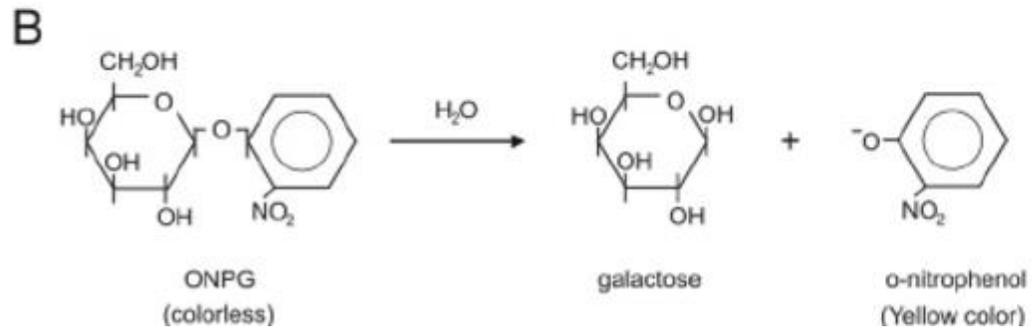
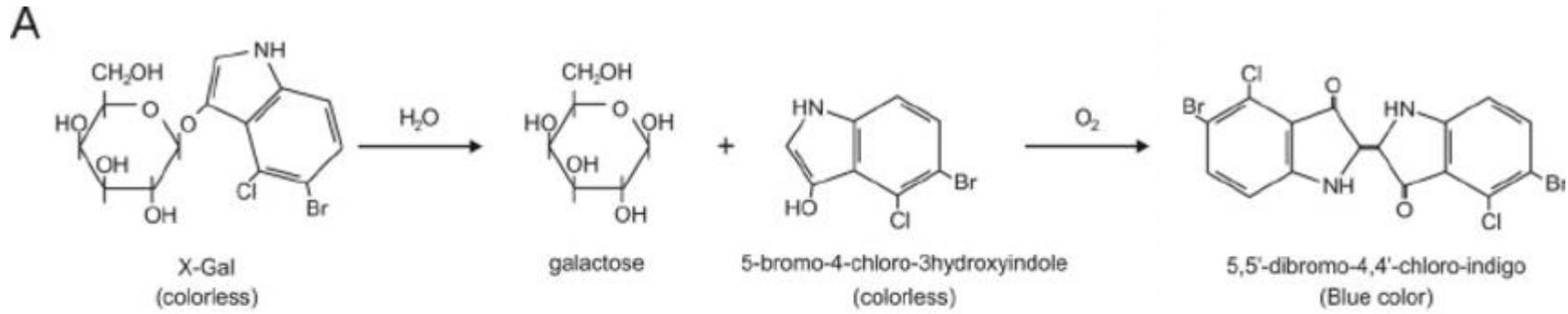


(b) Glucose present (cAMP low); lactose present



(c) No glucose present (cAMP high); lactose present





# Conceptos de clonado

# Elementos básicos

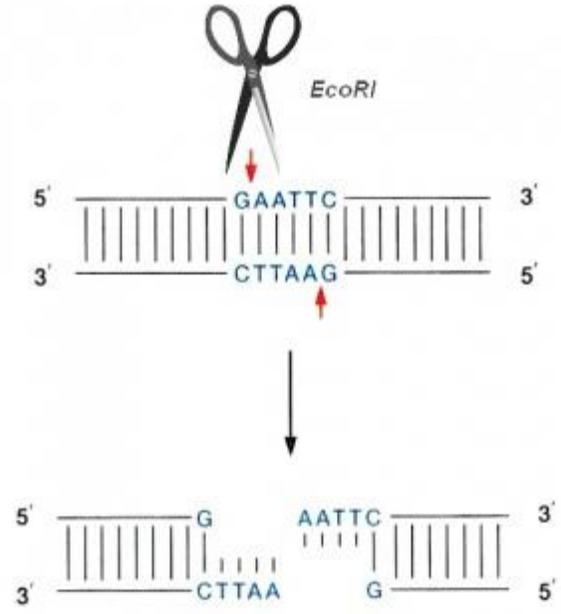
Endonucleasas de restricción

Vectores de clonado

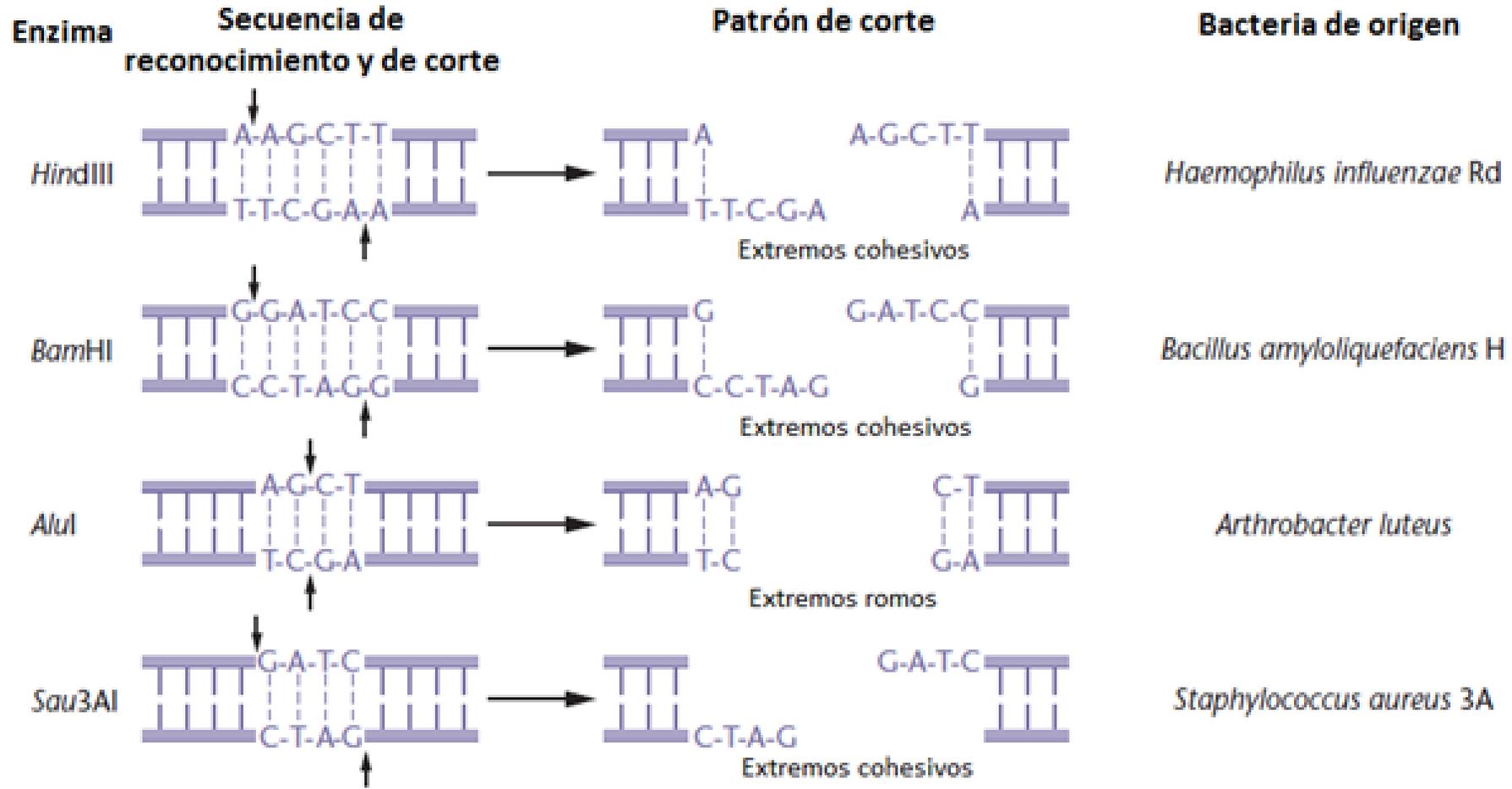
Fragmento de ADN a ser insertado

Métodos de transformación

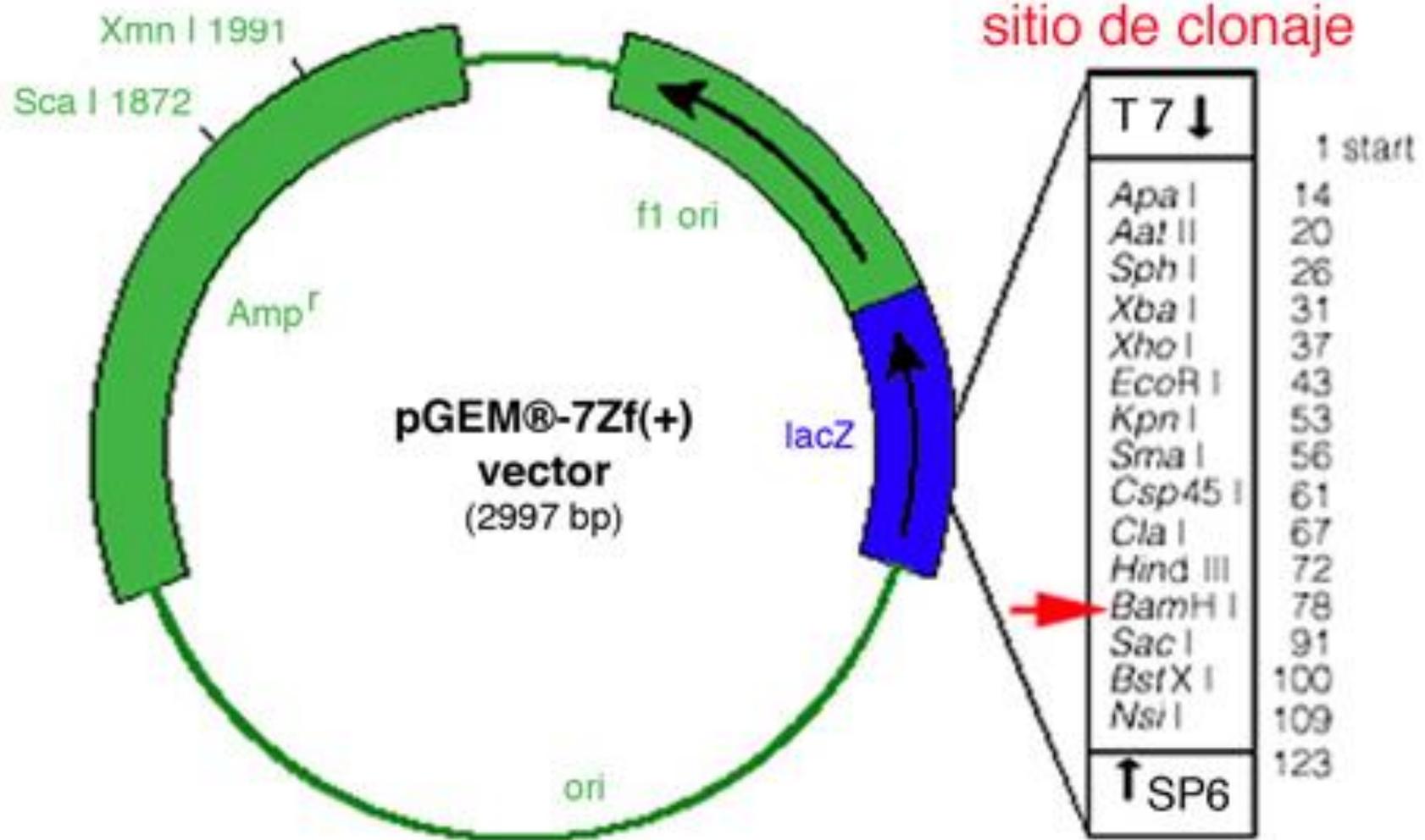
# Endonucleasa de restricción



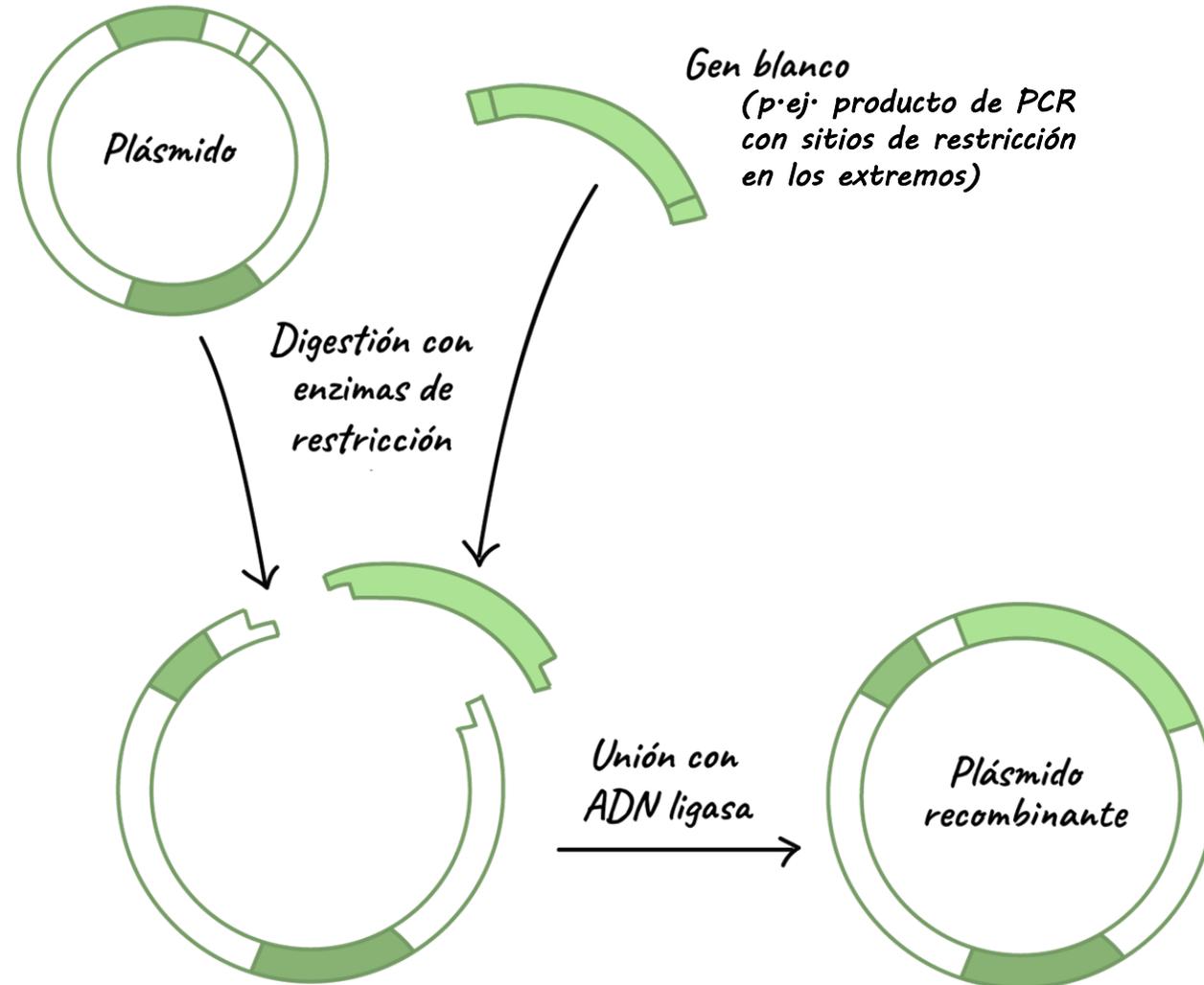
## Existen diversas endonucleasas de restricción



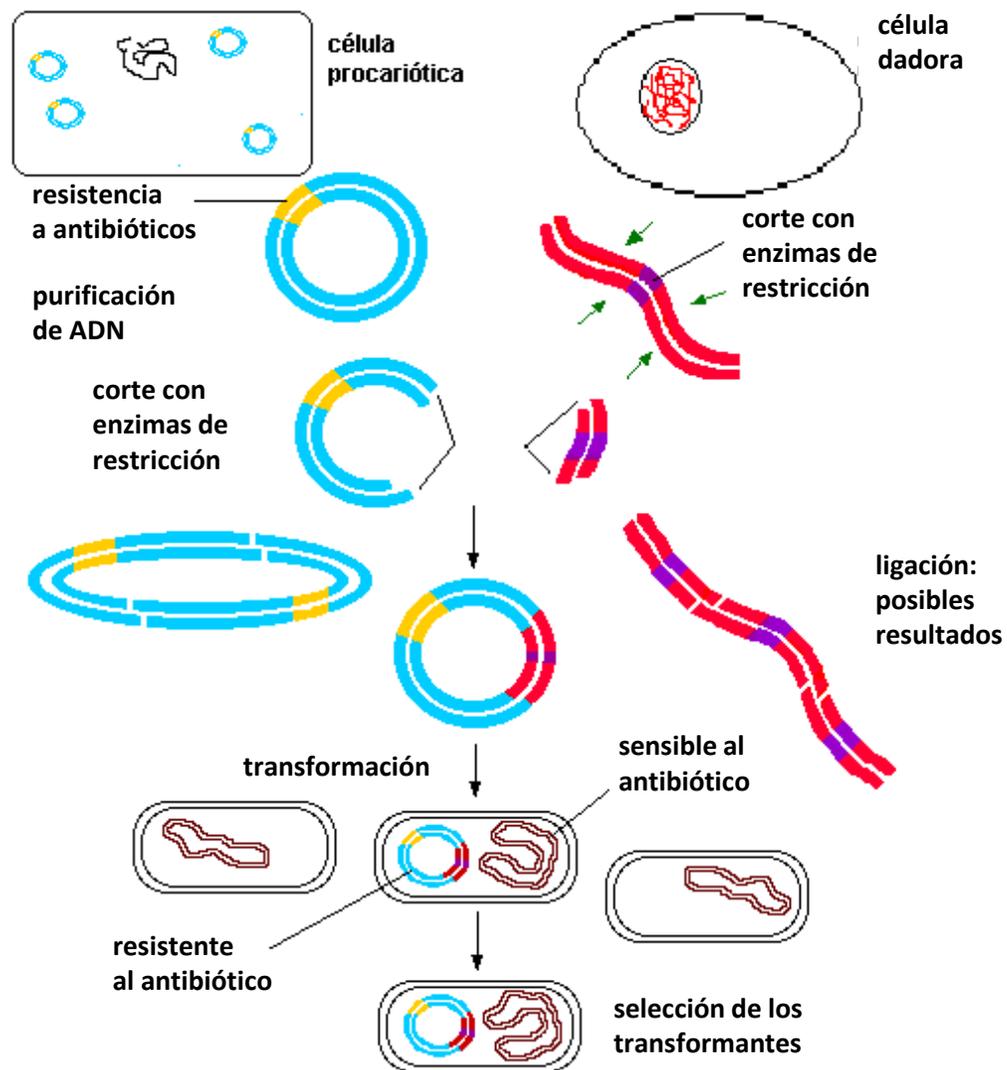
# Plásmido como vector de clonado



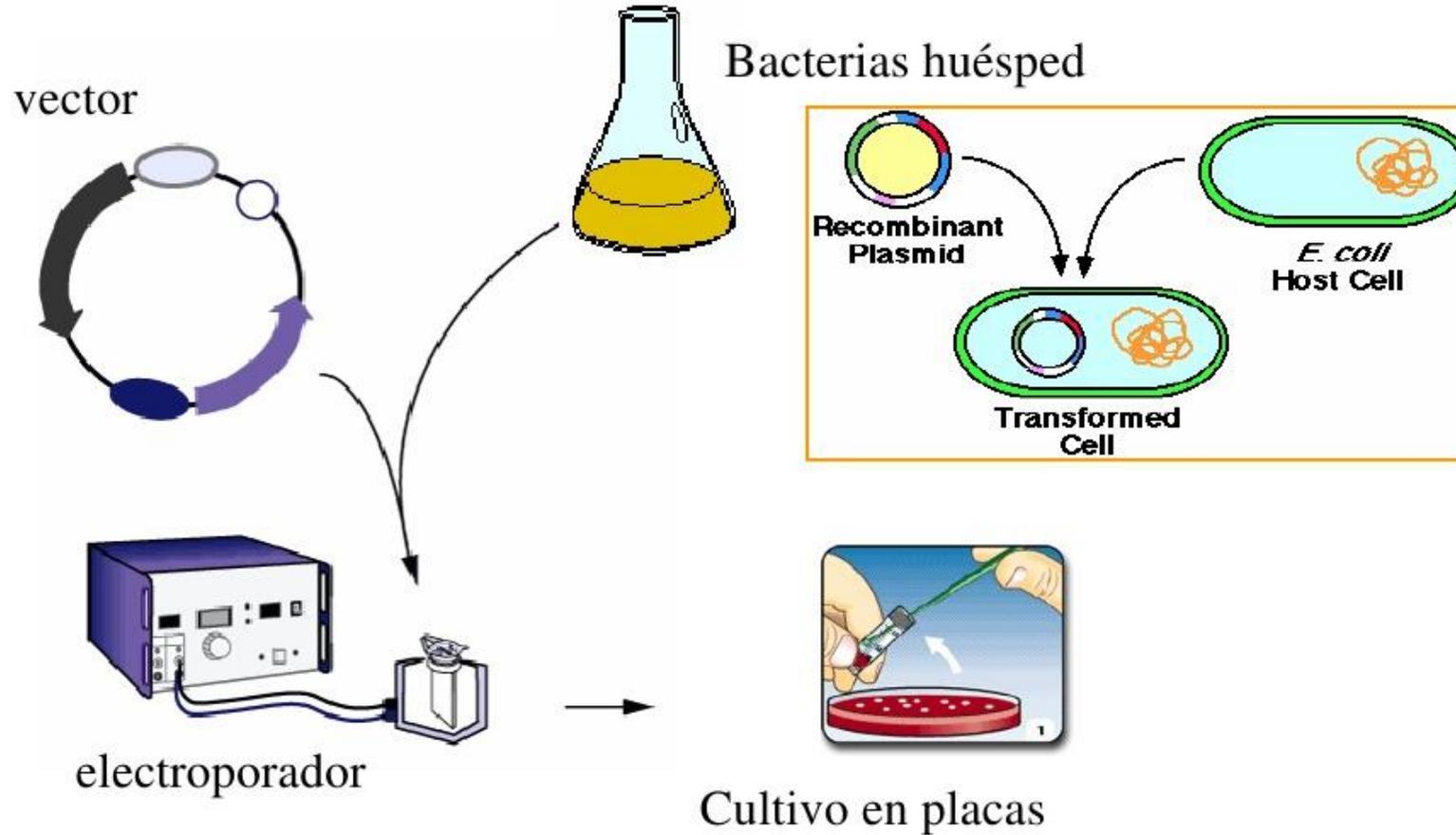
## Inserción del fragmento de ADN



# Procedimiento de clonado



# Transformación de bacterias por Electroporación



20 de Enero 2012

## Selección con antibióticos y X-Gal

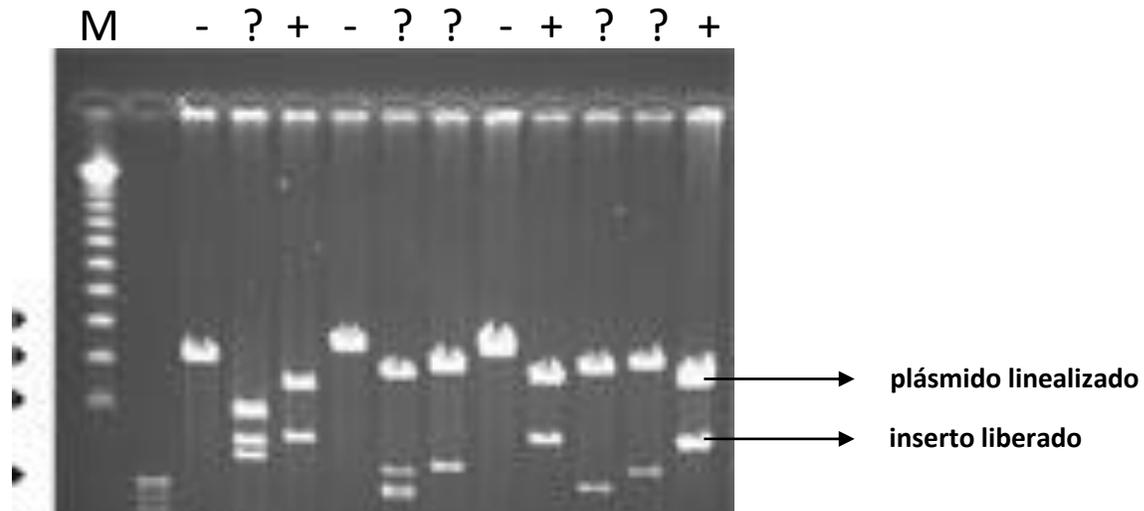


Colonia azul  
sin inserto

Colonia blanca  
con inserto

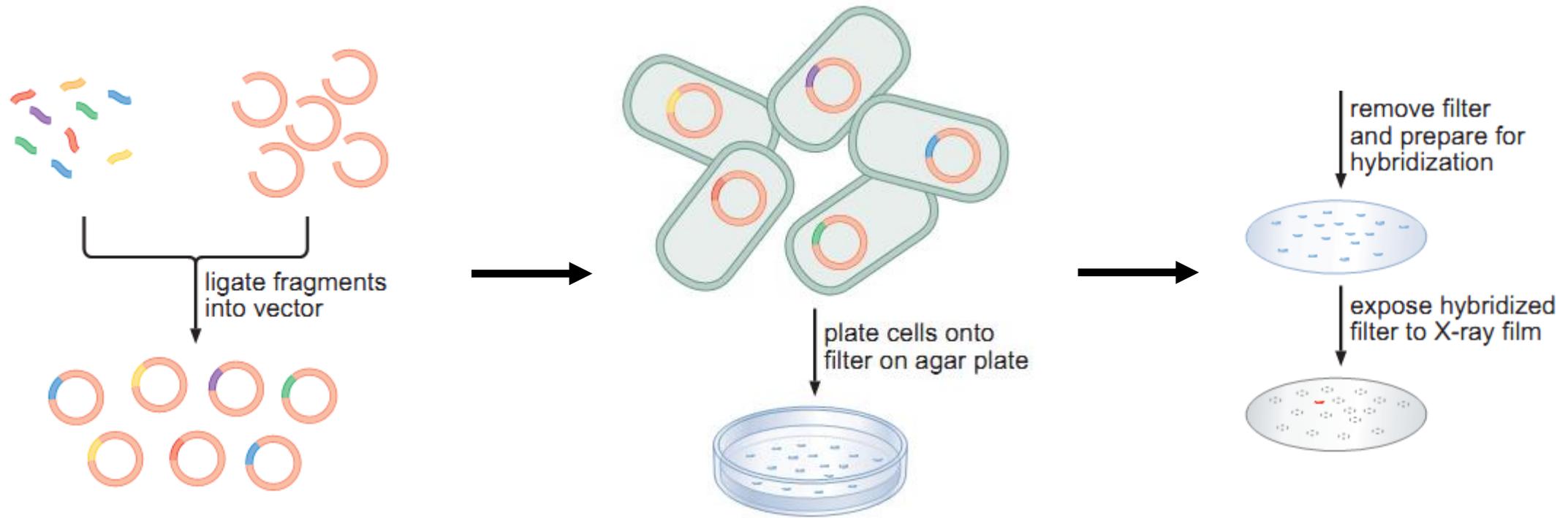
Extracción de ADN de algunos clones y confirmación por digestión (también puede hacerse por PCR)

Algunos clones poseen el inserto con el tamaño esperado (+), otros no (-) y otros poseen insertos de tamaños diferentes al deseado (?), lo cual puede calcularse fácilmente usando los marcadores de peso molecular (M)



\*El tamaño del plásmido linealizado en los (-) es mayor que en los (+) porque en estos últimos se removió parte del sitio de clonaje durante la inserción, pero no siempre es así.

# Insertos



$$N = \frac{\ln(1 - P)}{\ln(1 - f)}$$

$N$  is the necessary number of recombinants<sup>[16]</sup>

$P$  is the desired probability that any fragment in the genome will occur at least once in the library created

$f$  is the fractional proportion of the genome in a single recombinant

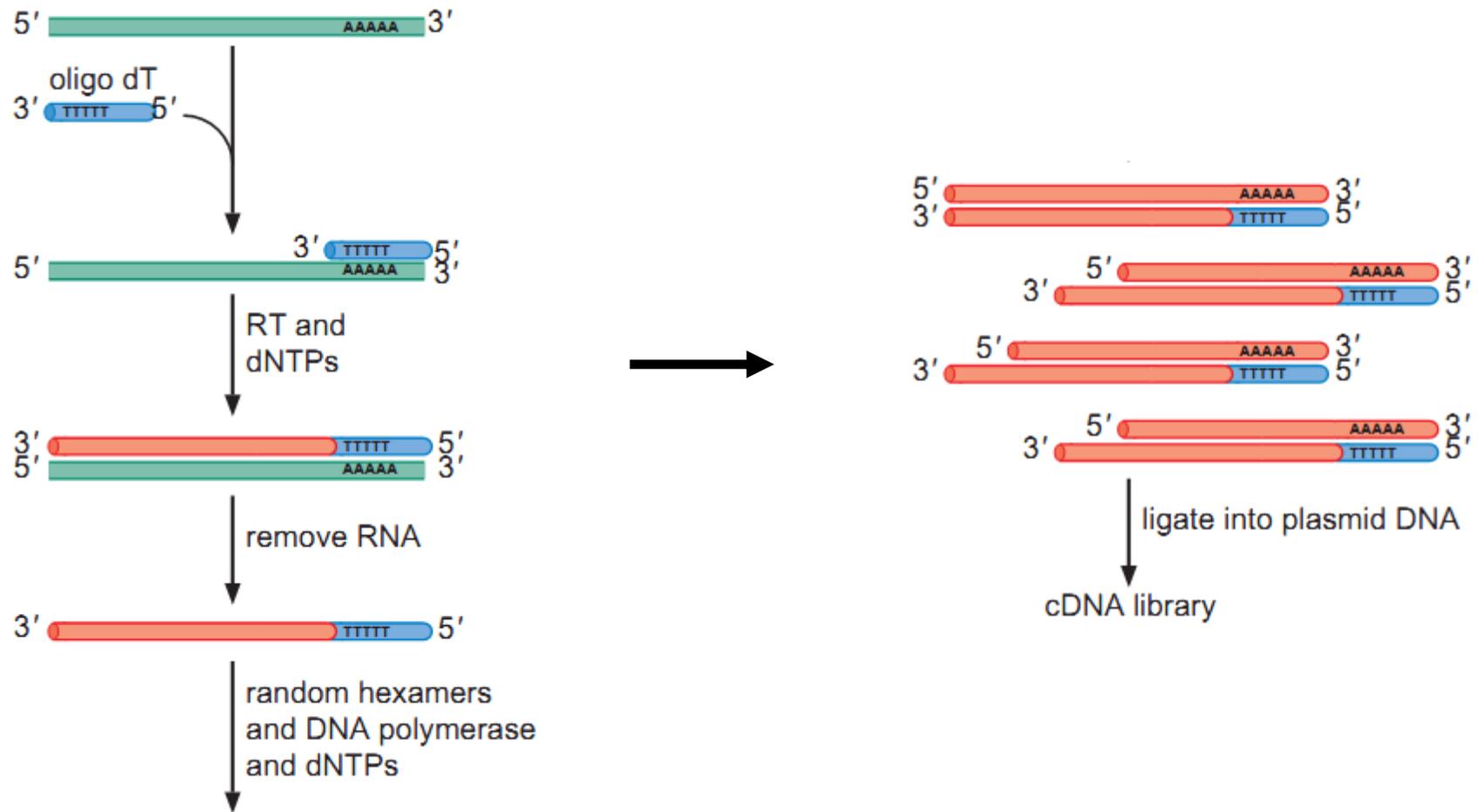
$f$  can be further shown to be:

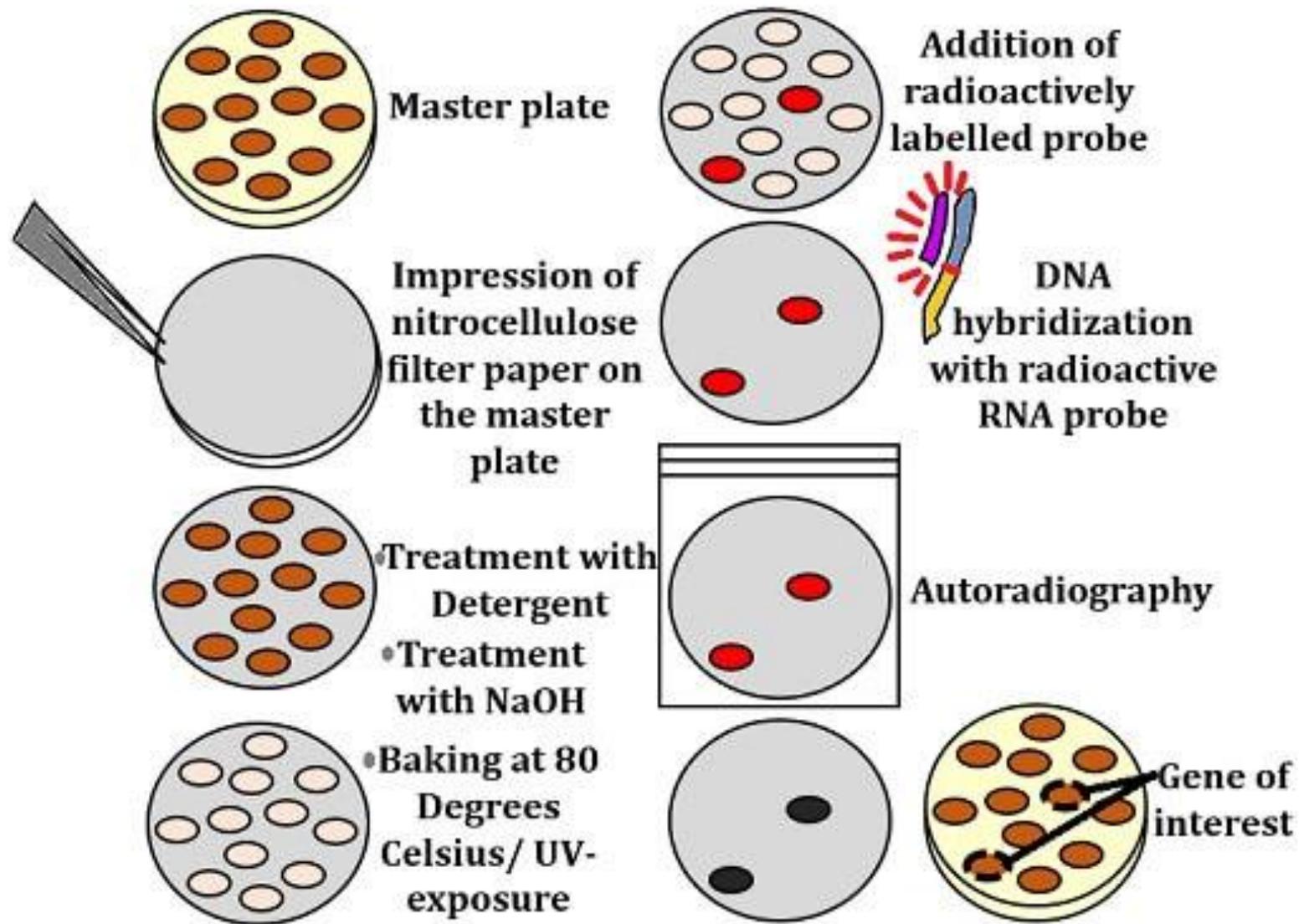
$$f = \frac{i}{g}$$

where,

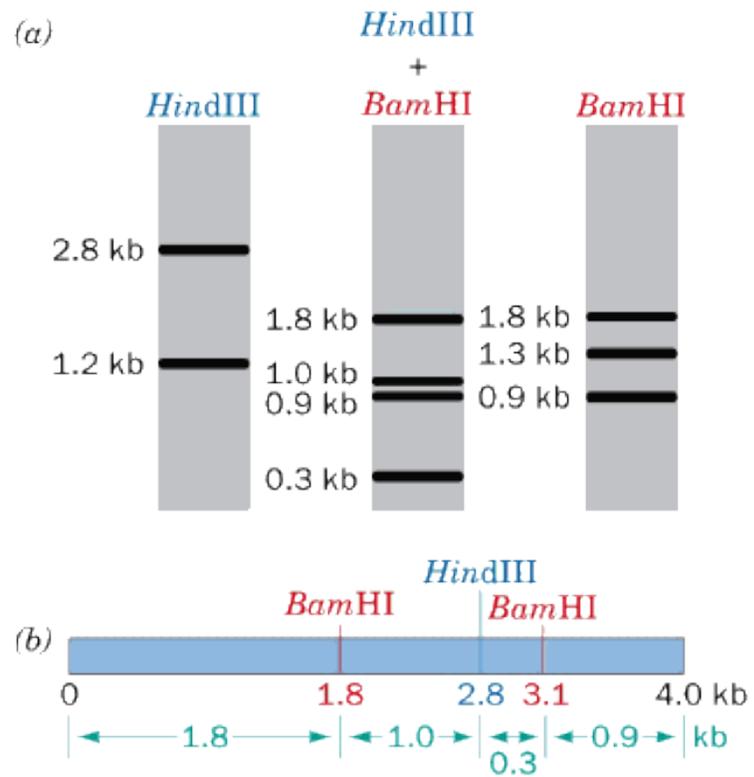
$i$  is the insert size

$g$  is the genome size

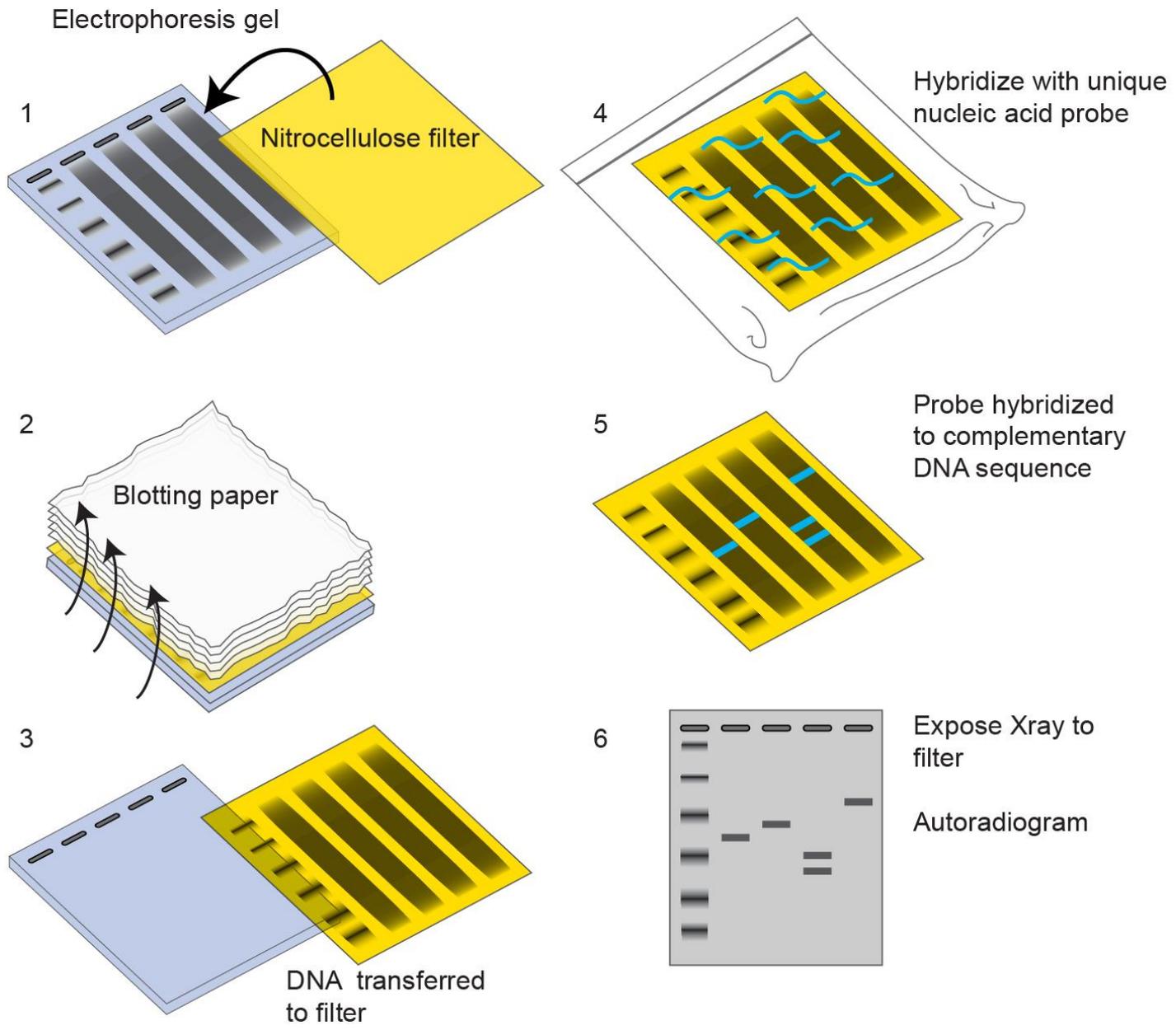




**COLONY HYBRIDIZATION**



Construction of a restriction map

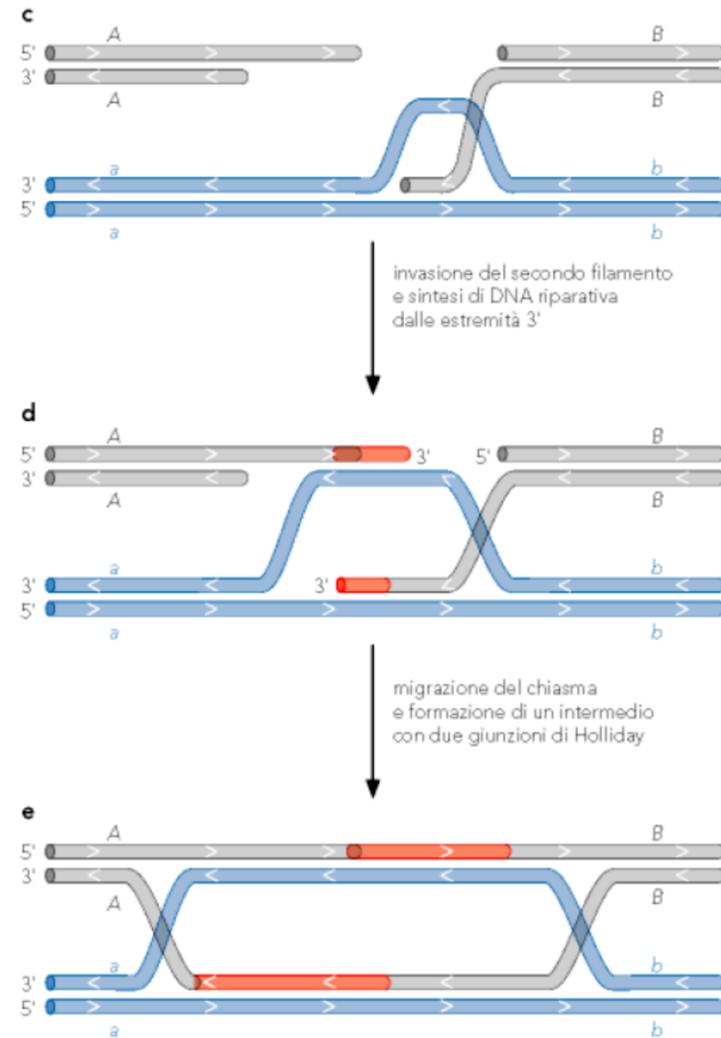
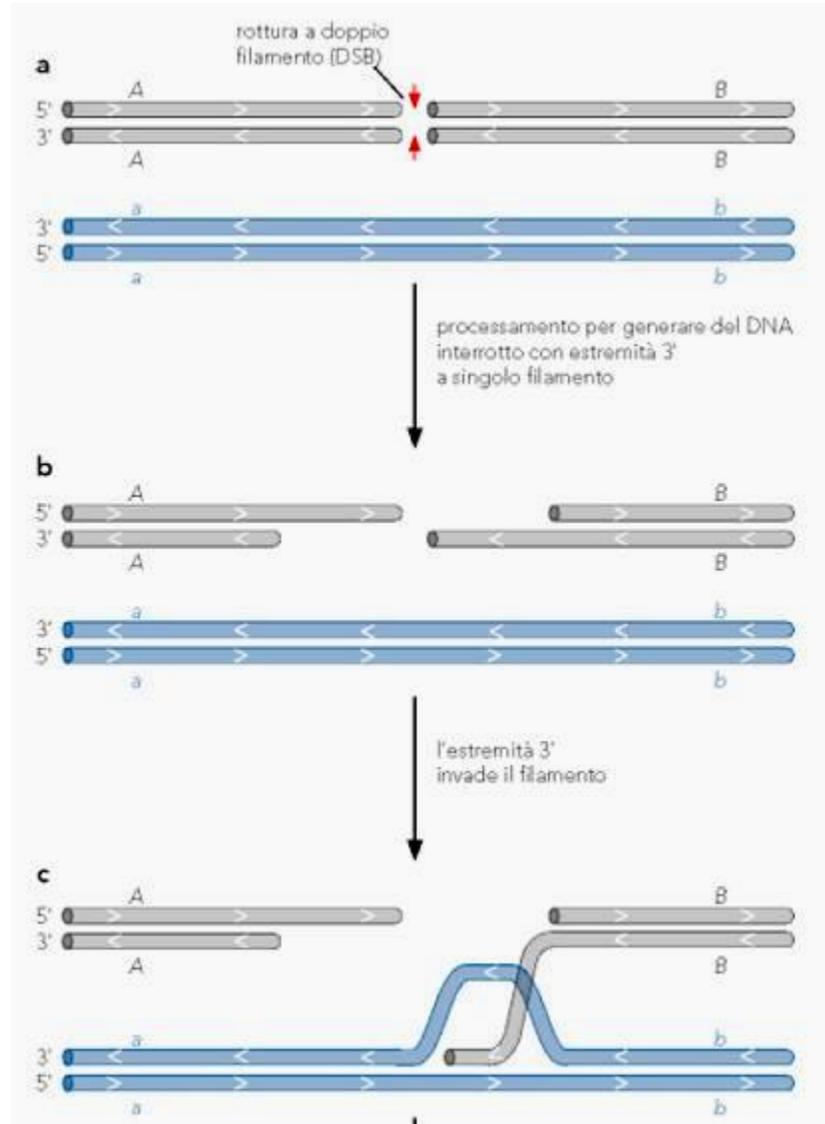


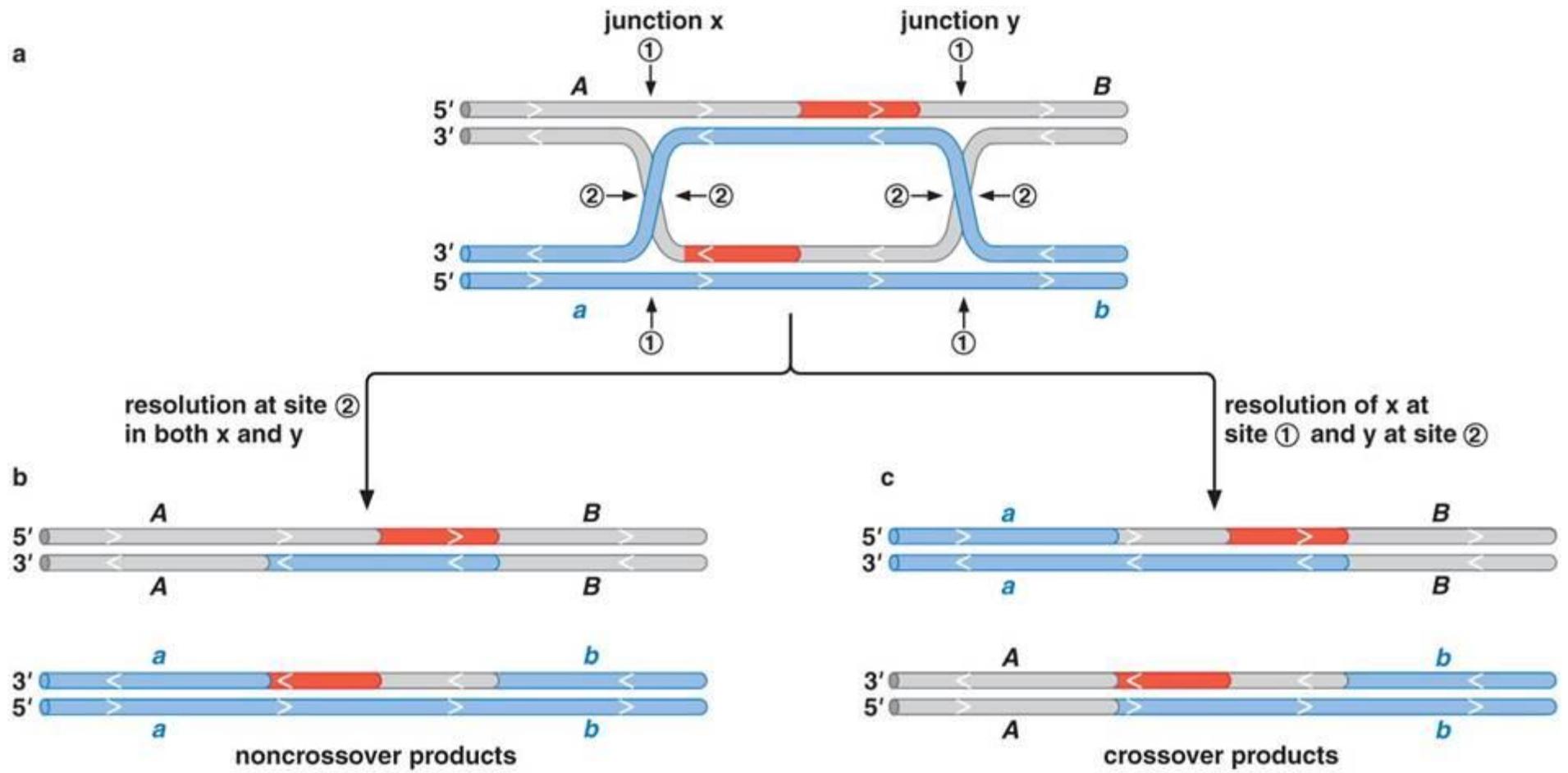
<b>Enzima</b>	<b>Acción</b>	<b>Aplicación</b>
<b>Endonucleasas de tipo II</b>	<b>Clivaje sitioespecifico del ADN</b>	<b>Generación de fragmentos de ADN</b>
<b>Ligasa de ADN</b>	Unión de dos fragmentos de ADN con extremos romos, en presencia de ATP.	Forma enlaces covalentes entre el extremo 5' de una cadena polinucleotídica y el extremo 3' de otra cadena
<b>Transcriptasa reversa</b>	Síntesis de una hebra de ADNc utilizando como molde ARN.	Construcción de bibliotecas de cDNA. Amplificación por PCR
<b>Polinucleotido kinasa</b>	Incorporación de un grupo fosfato al extremo 5' de un polinucleótido.	Permite ligado con otro polinucleótido o incorporación de fosfato marcado.
<b>Transferasa Terminal</b>	Adición de colas homopoliméricas al extremo 3'OH de ADN doble hebra lineal	Genera extremos cohesivos oligo dT u oligo dA
<b>Exonucleasa III</b>	Remoción de nucleótidos del extremo 3' de un ADN doble hebra.	Expone los extremos 5'.
<b>Exonucleasa del fago I</b>	Remoción de nucleótidos del extremo 5' de ADN doble hebra.	Expone los extremos 3'.
<b>Fosfatasa alcalina</b>	Remoción de fosfatos terminales de extremos 5'	Impide autoligado de vectores. Permite la incorporación de fosfato 5' marcado.
<b>Fragmento klenow</b>	Fragmento de una enzima ADN polimerasa, con actividad DNA polimerasa y exonucleasa en dirección 3'→5'.	Genera extremos romos desde el extremo 3', por síntesis complementaria o clivaje de nucleótidos desapareados.

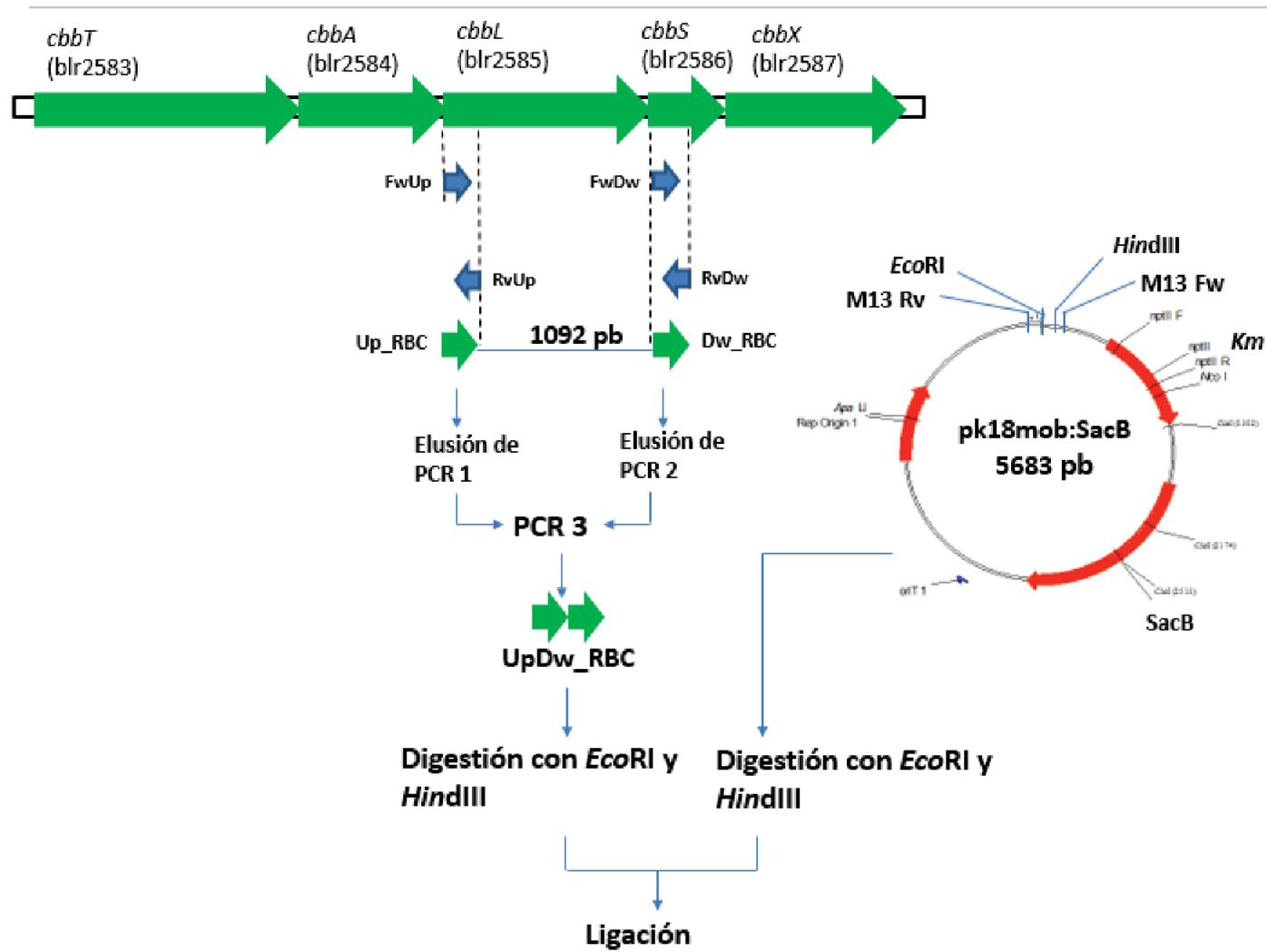
**Tabla 1.** Algunas enzimas utilizadas en la tecnología del ADN recombinante

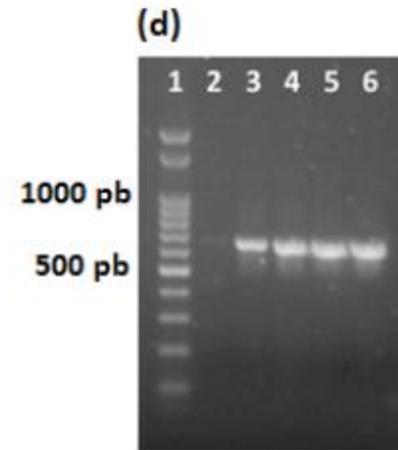
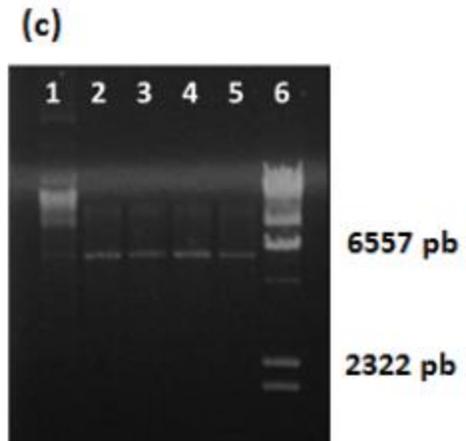
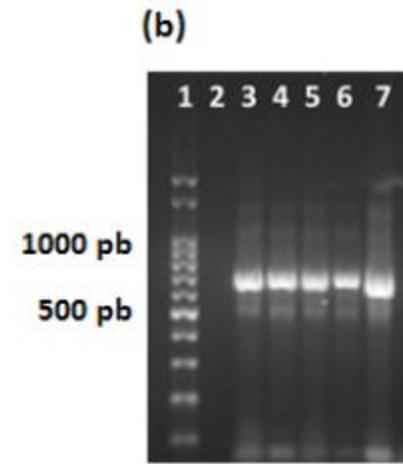
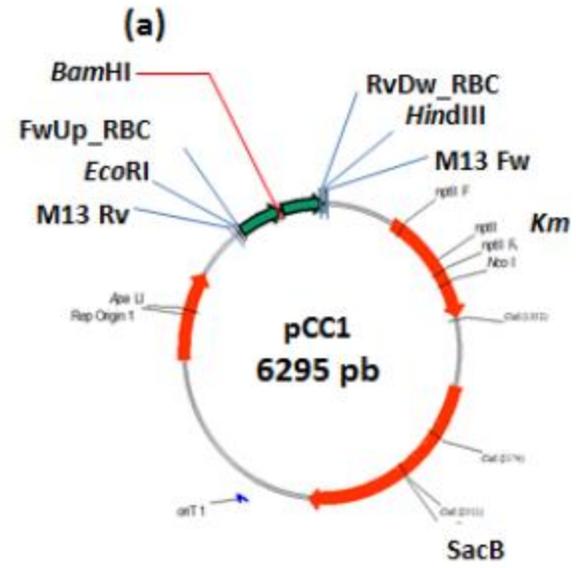
# **Obtención de recombinantes en procariontas**

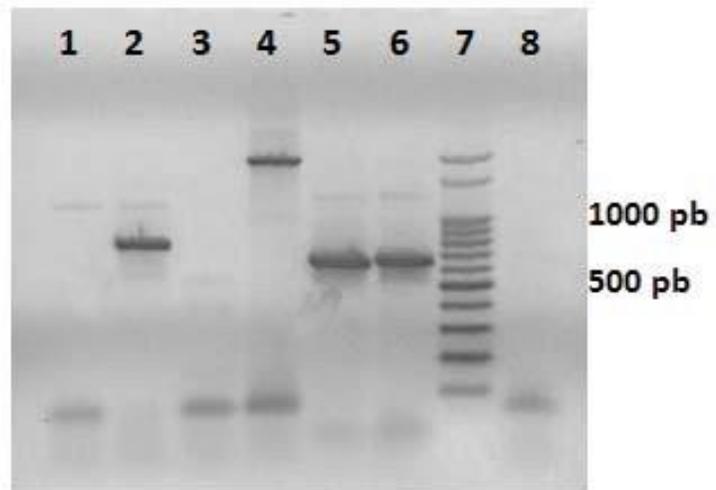
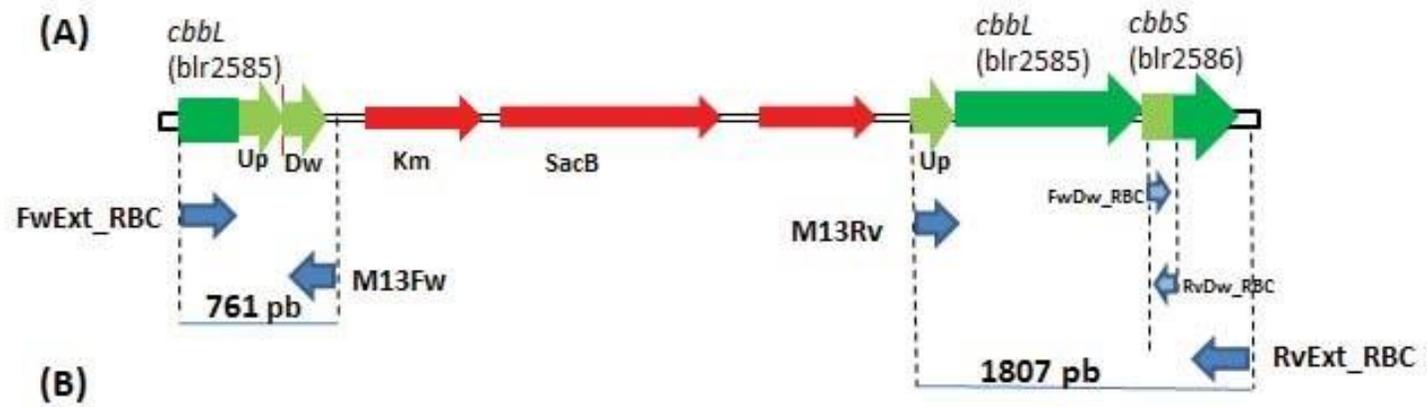
# Modelo de recombinación homóloga iniciada por ruptura de doble cadena “*double strand break*” (DSB)

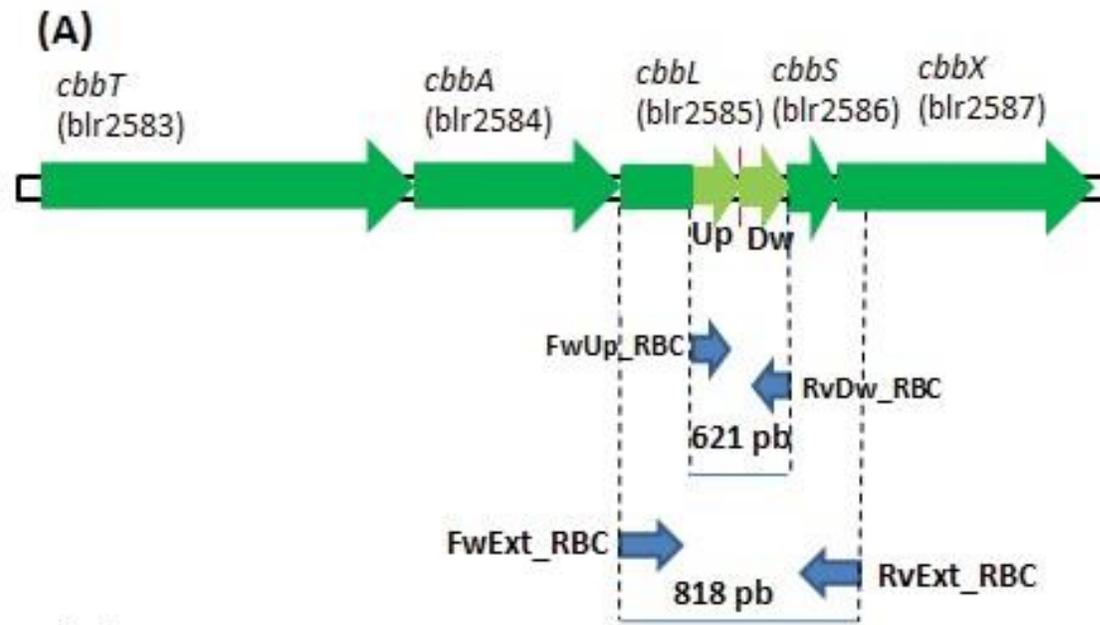




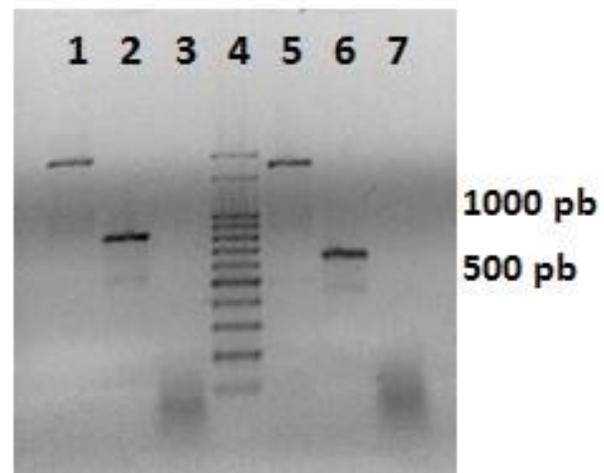


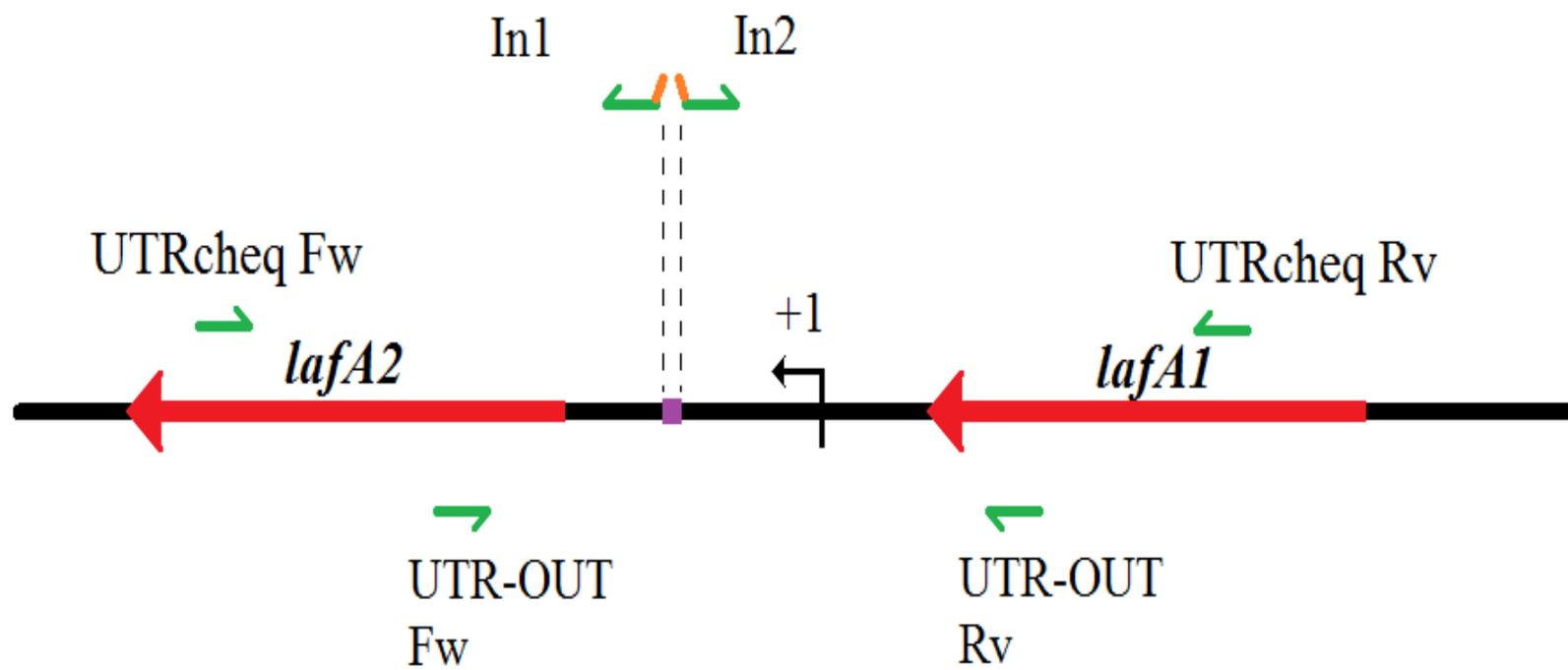


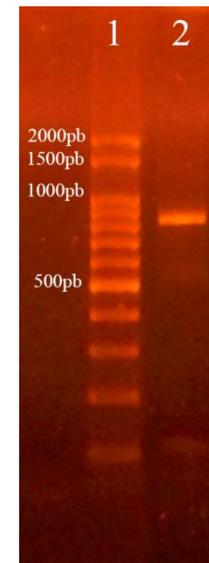
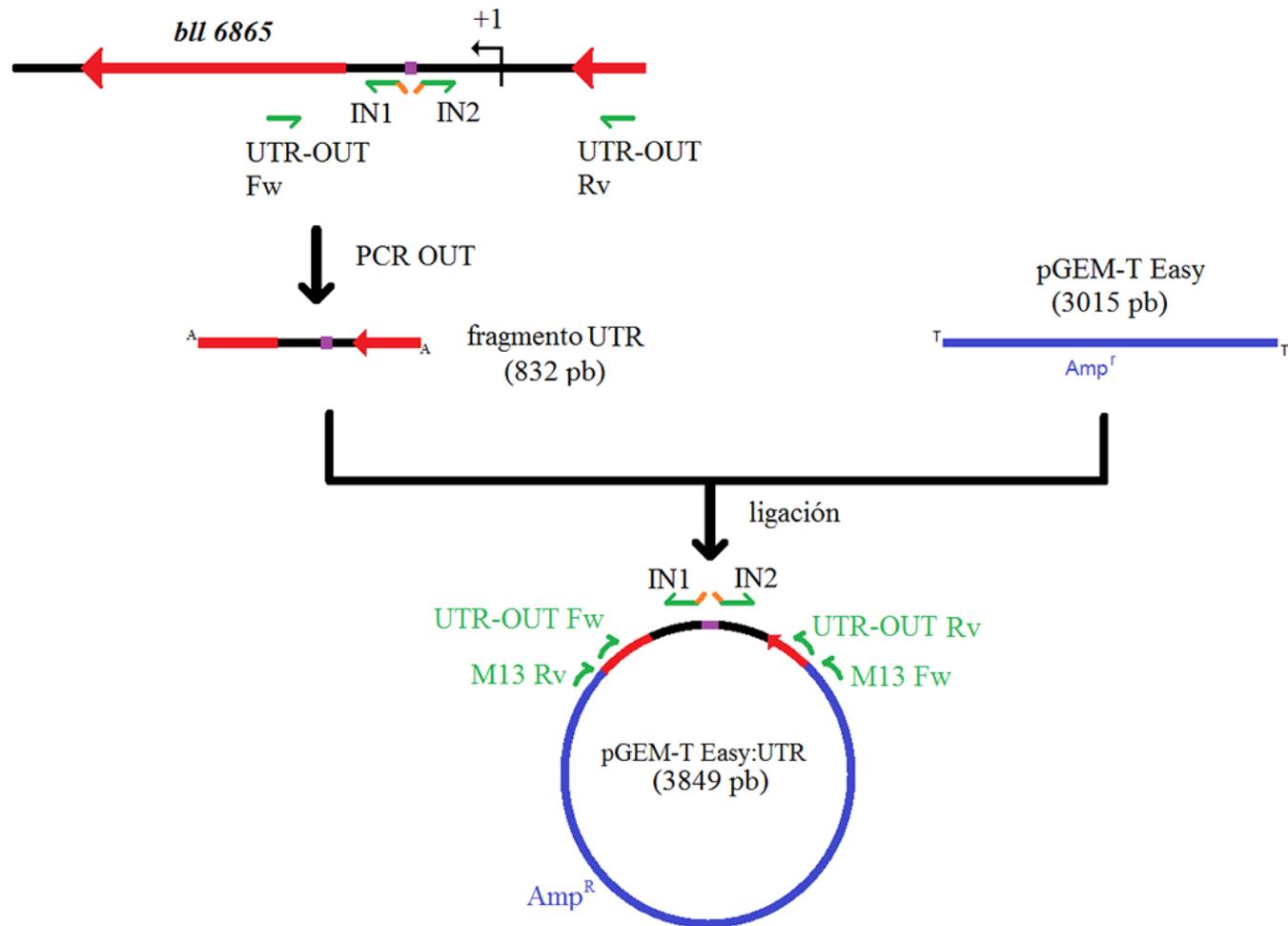


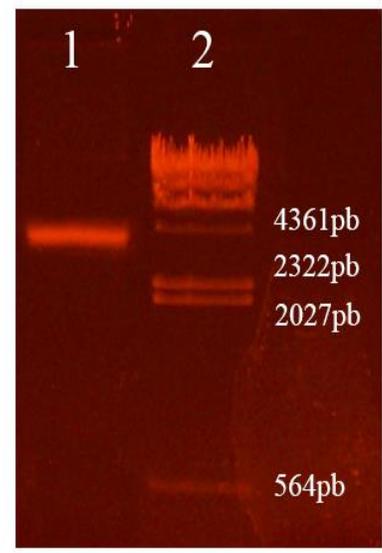
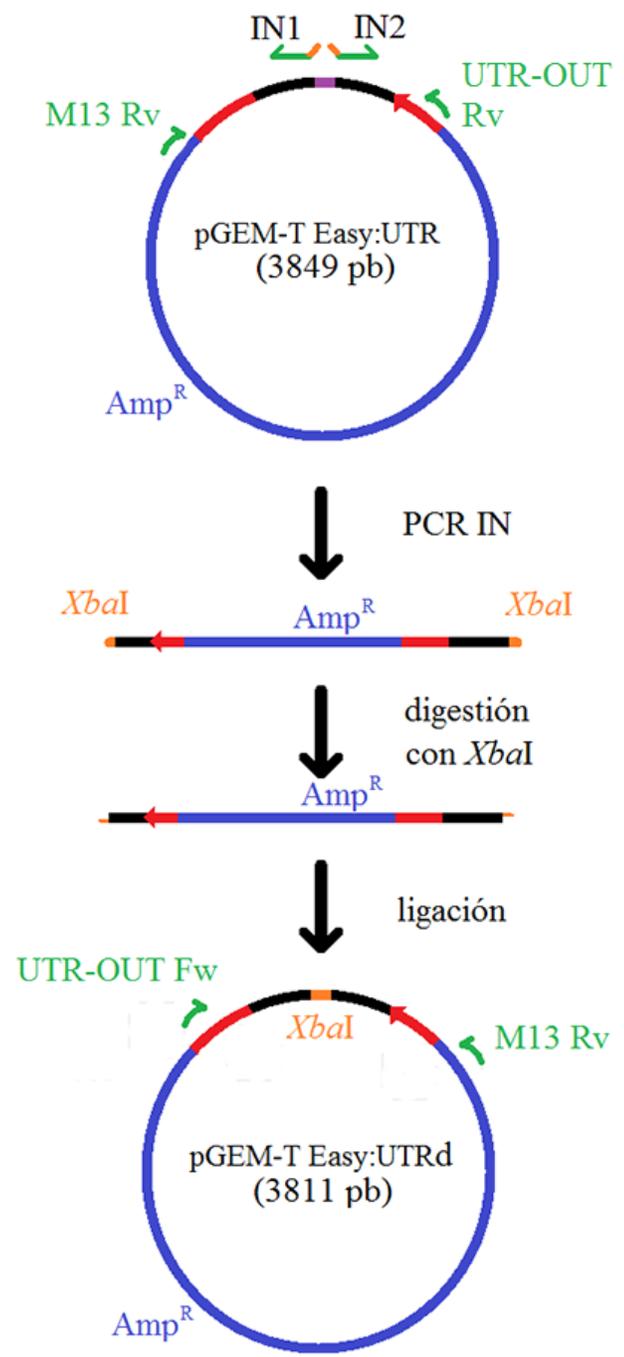


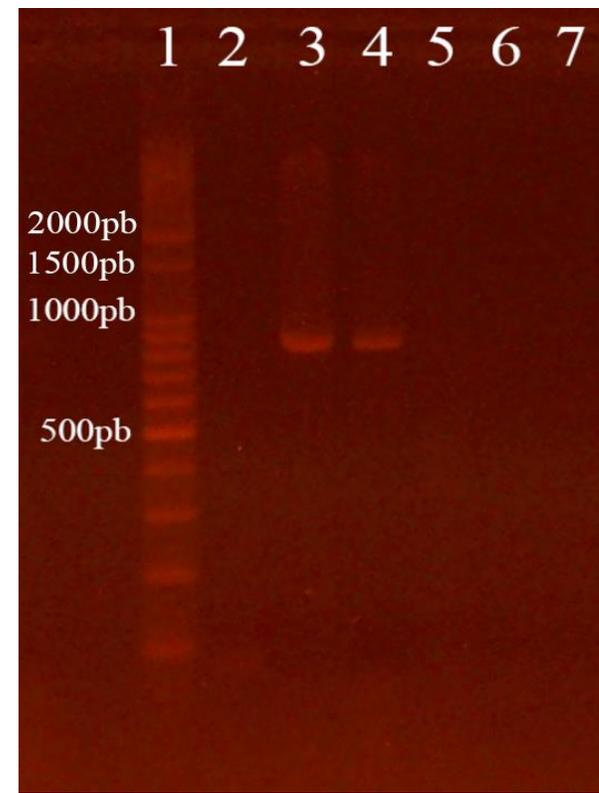
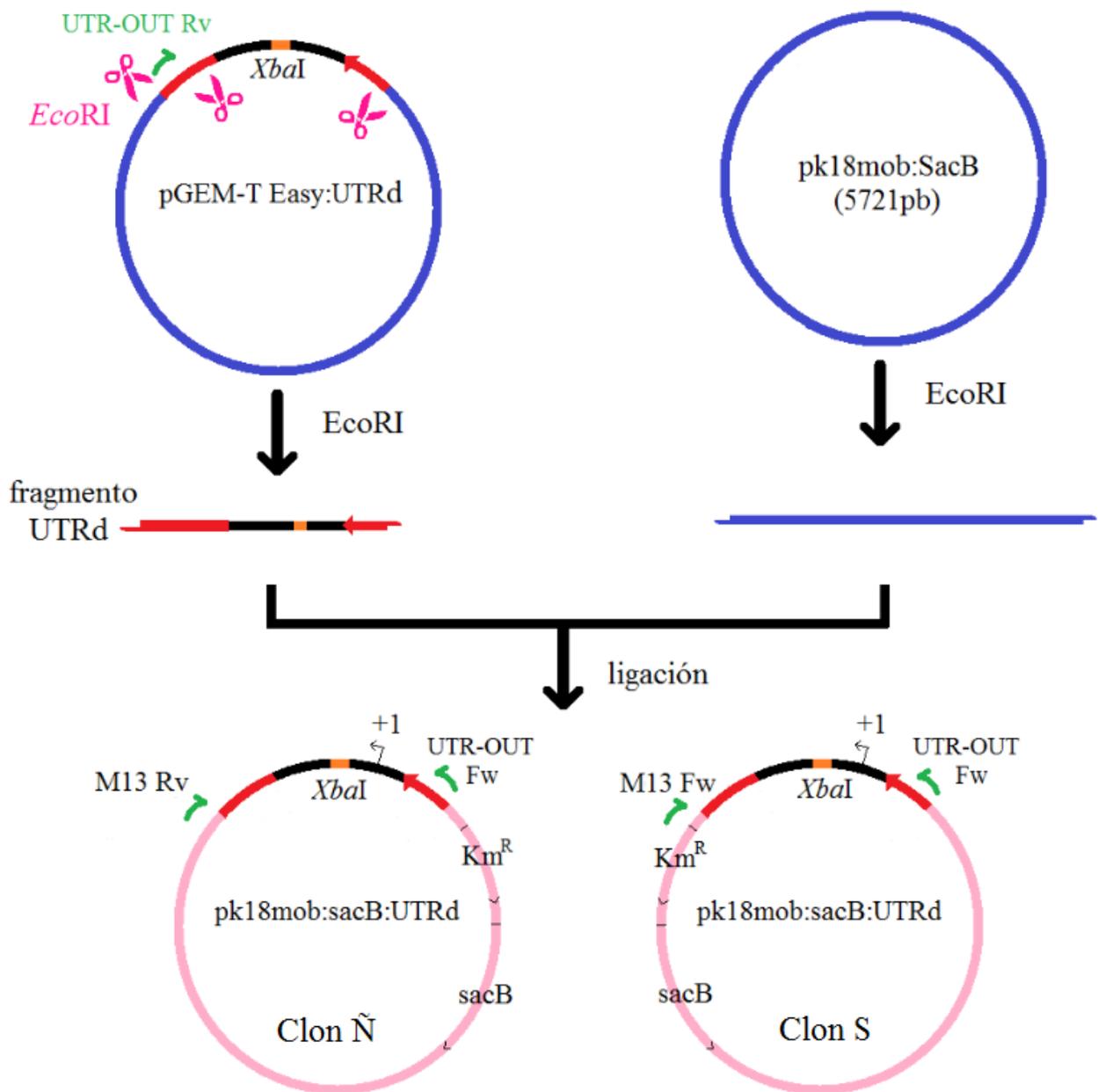
**(B)**



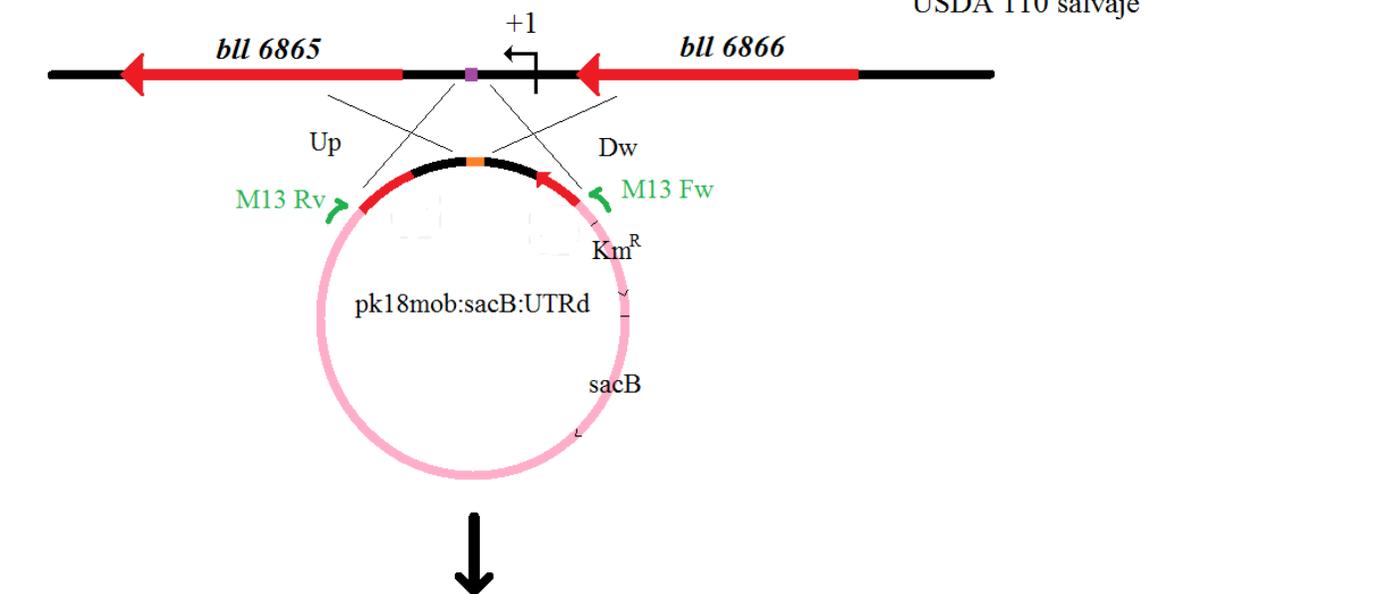




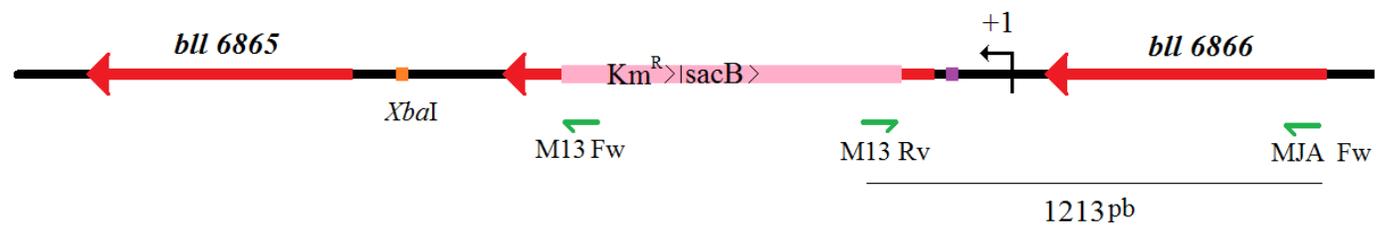




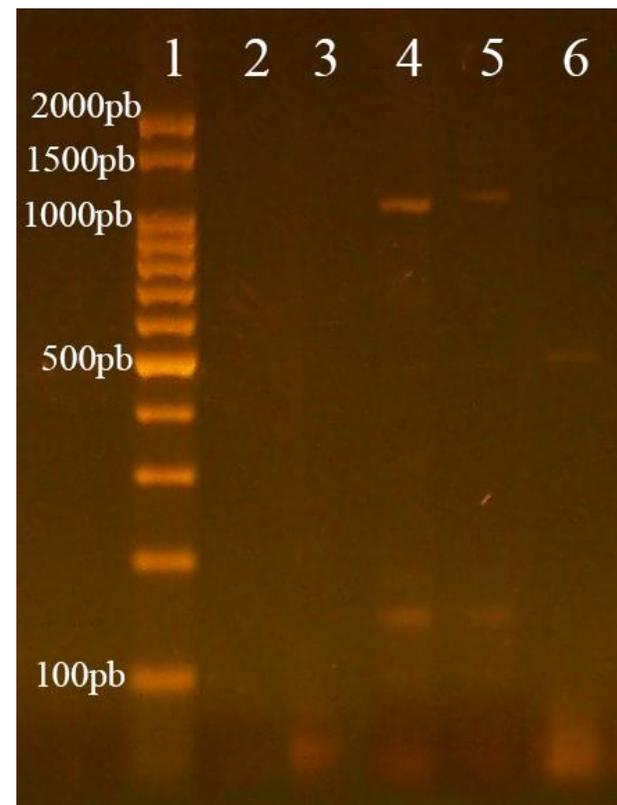
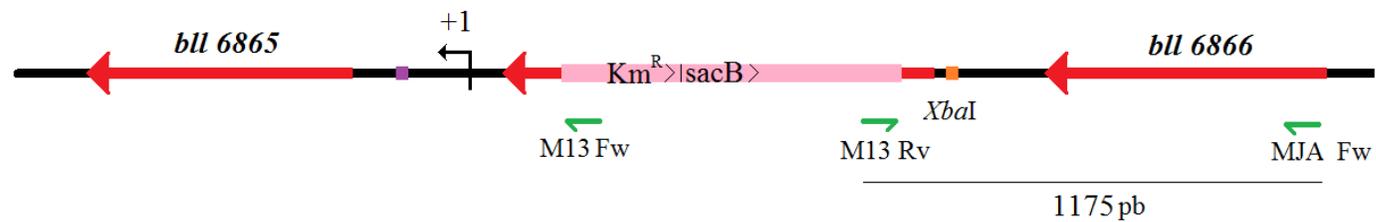
*B. diazoefficiens*  
USDA 110 salvaje

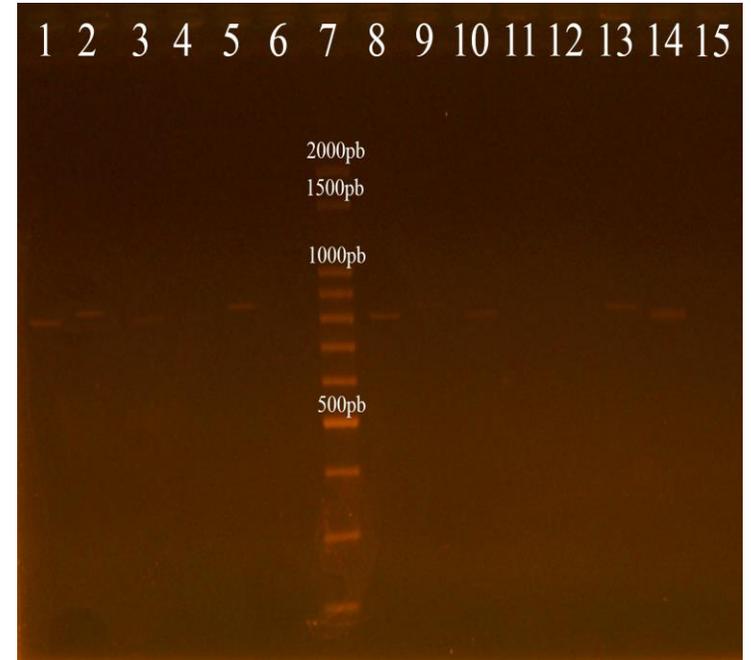
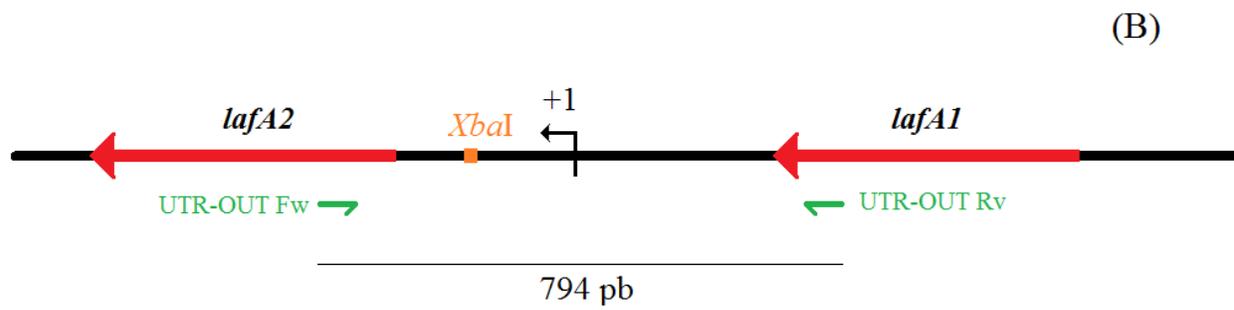
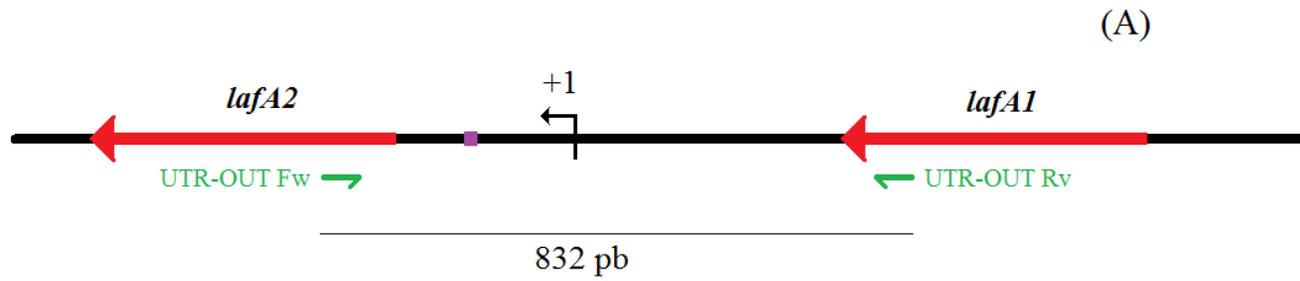


Recombinación por Up



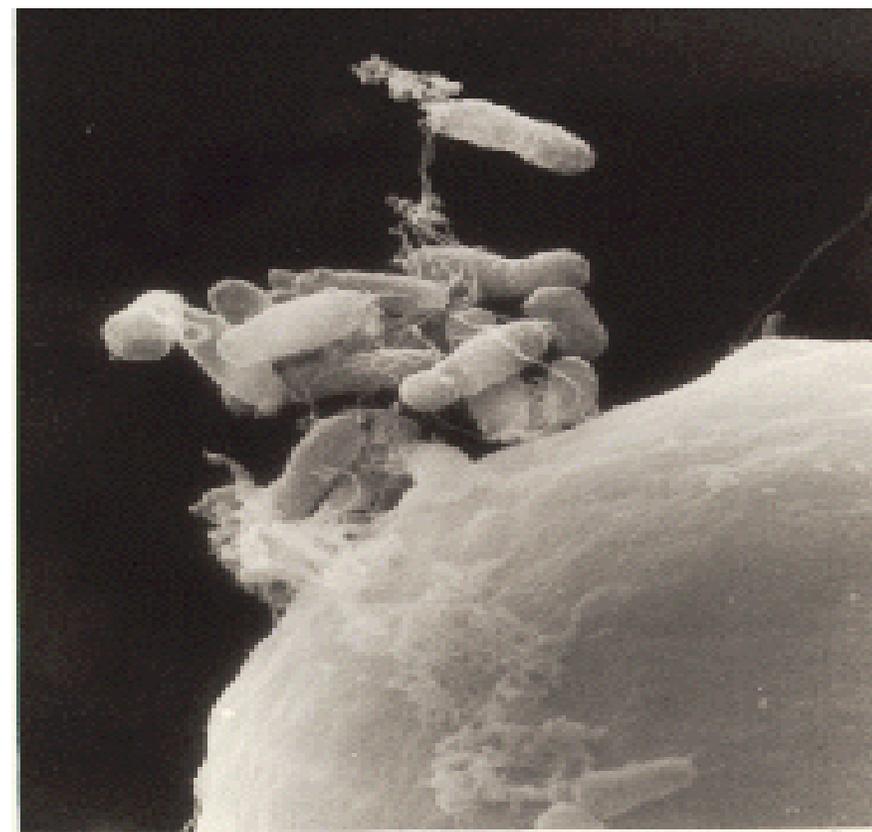
Recombinación por Dw



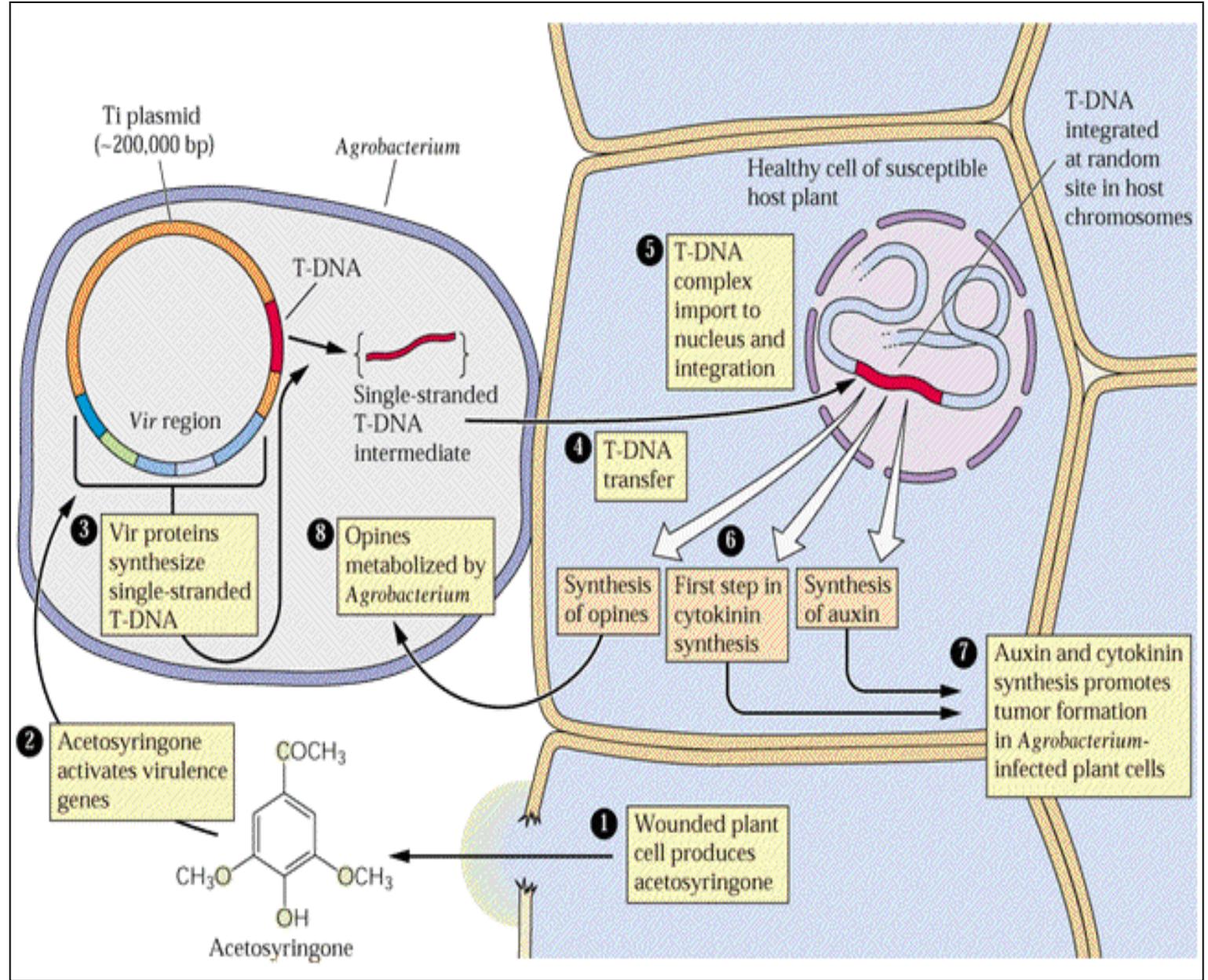
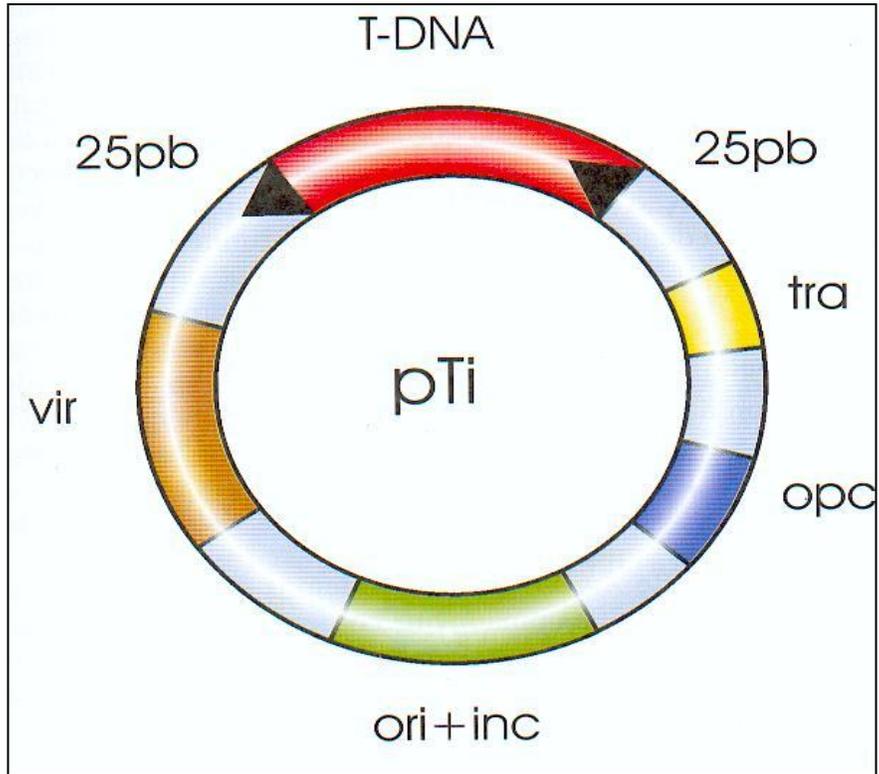


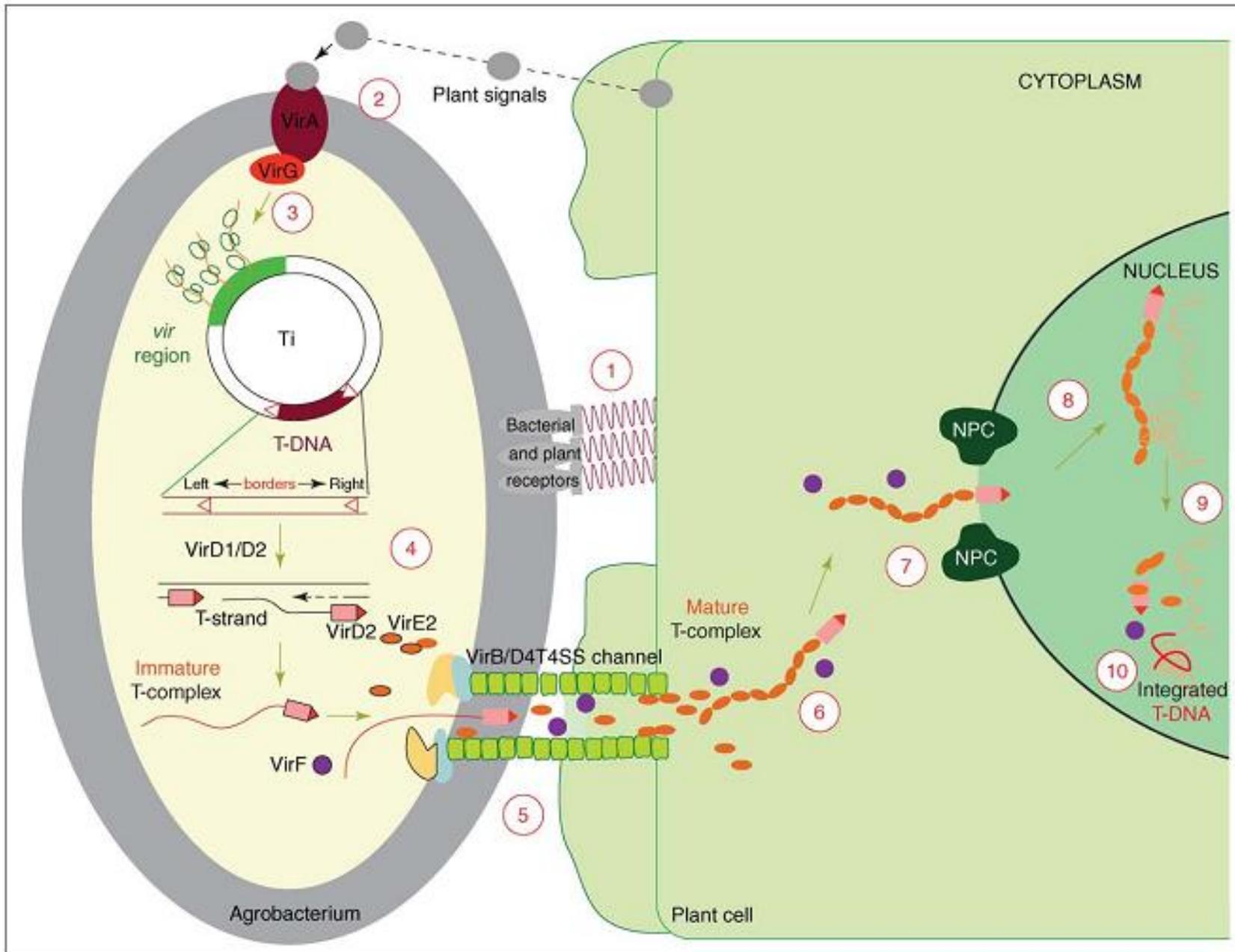
# Ingeniería Genética en Plantas

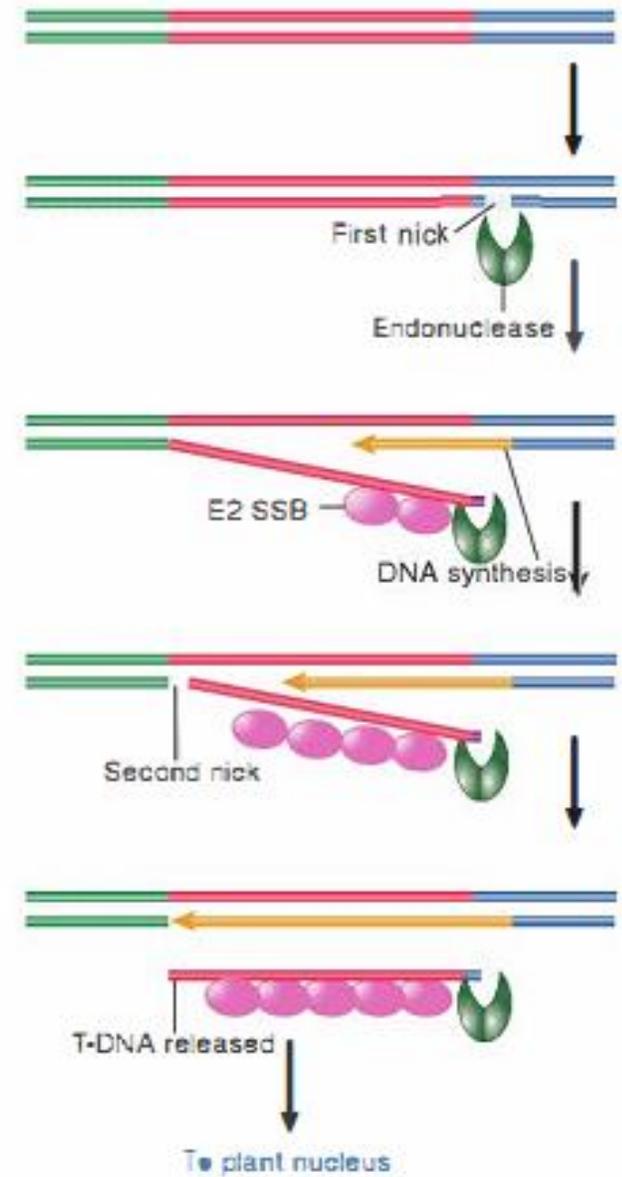
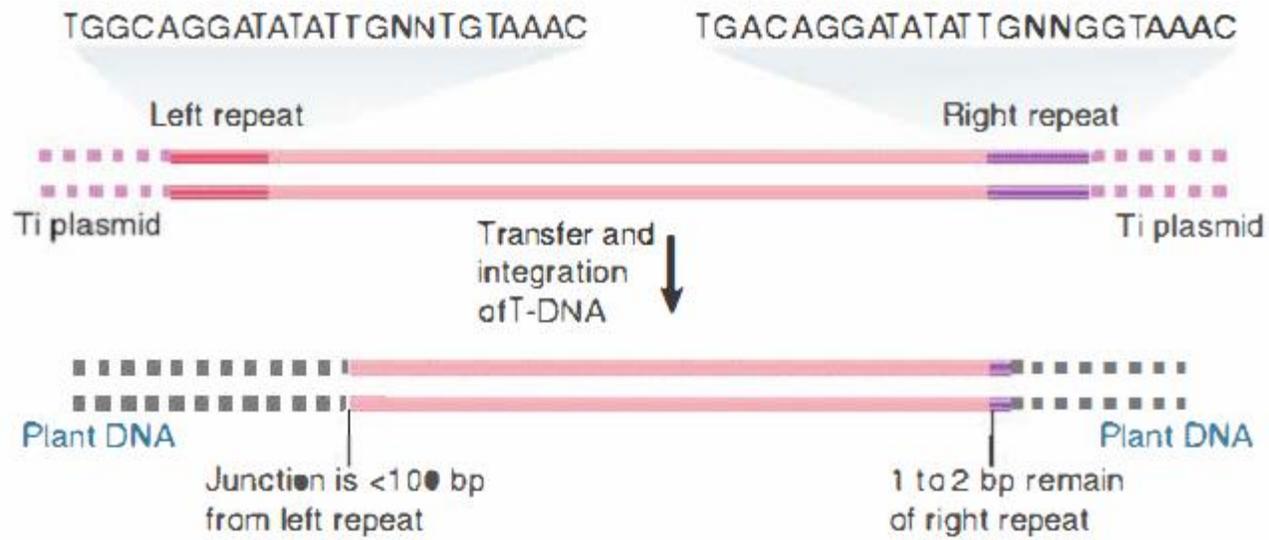
**Transformación genética: *Agrobacterium tumefaciens***

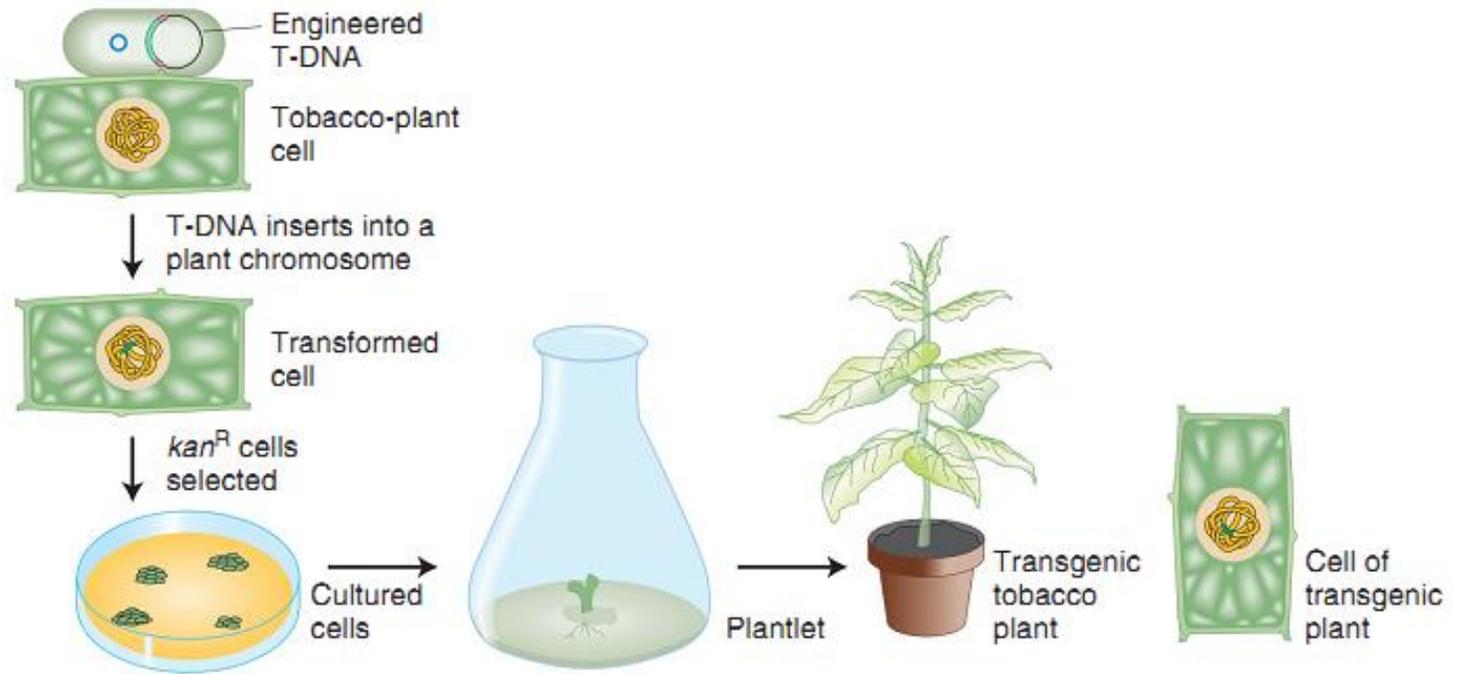
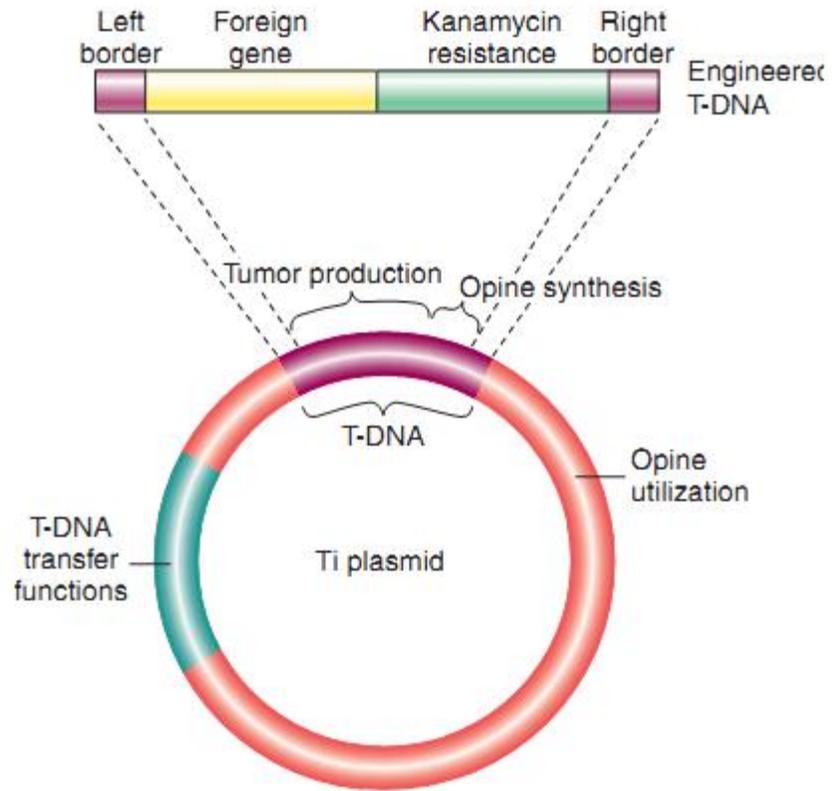


Introducción de ADN de *A. tumefaciens* en plantas



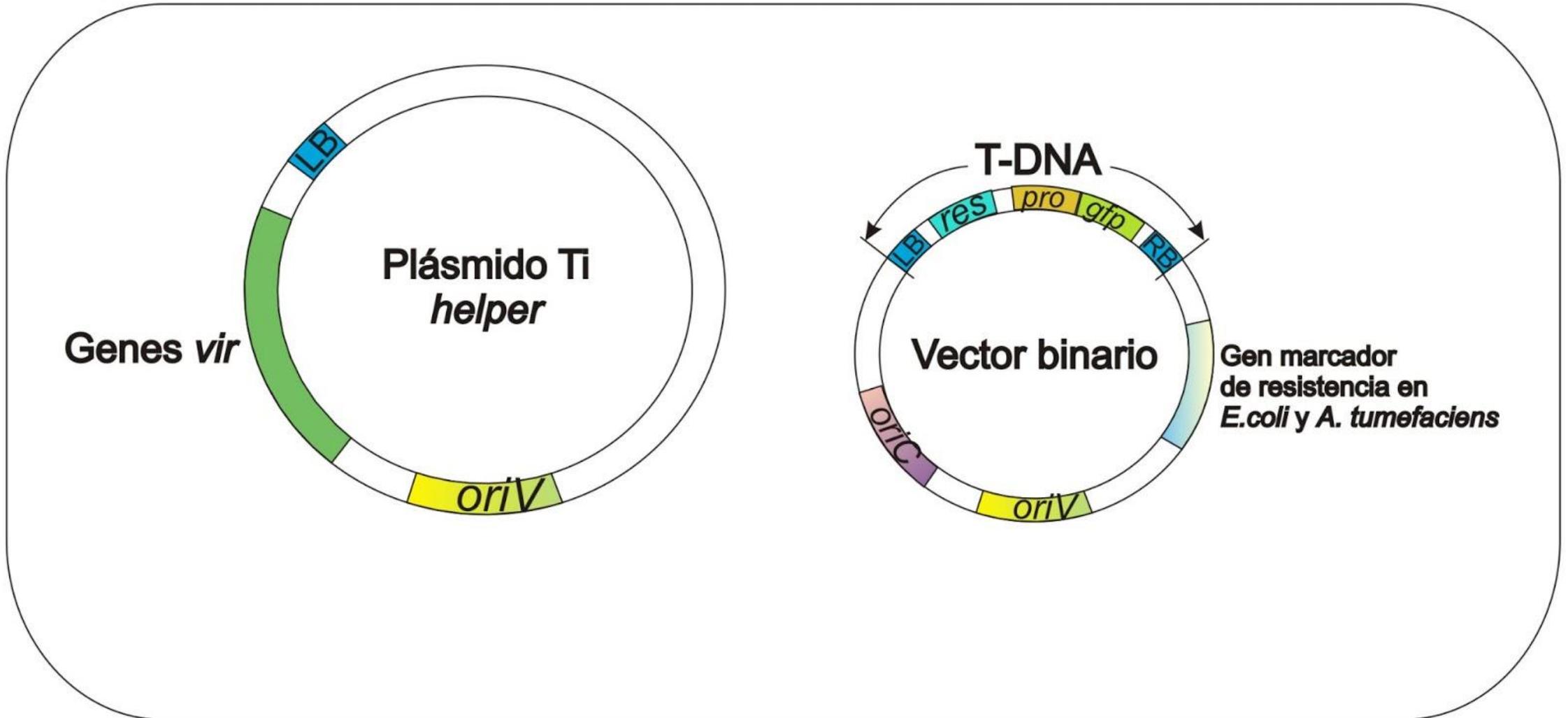




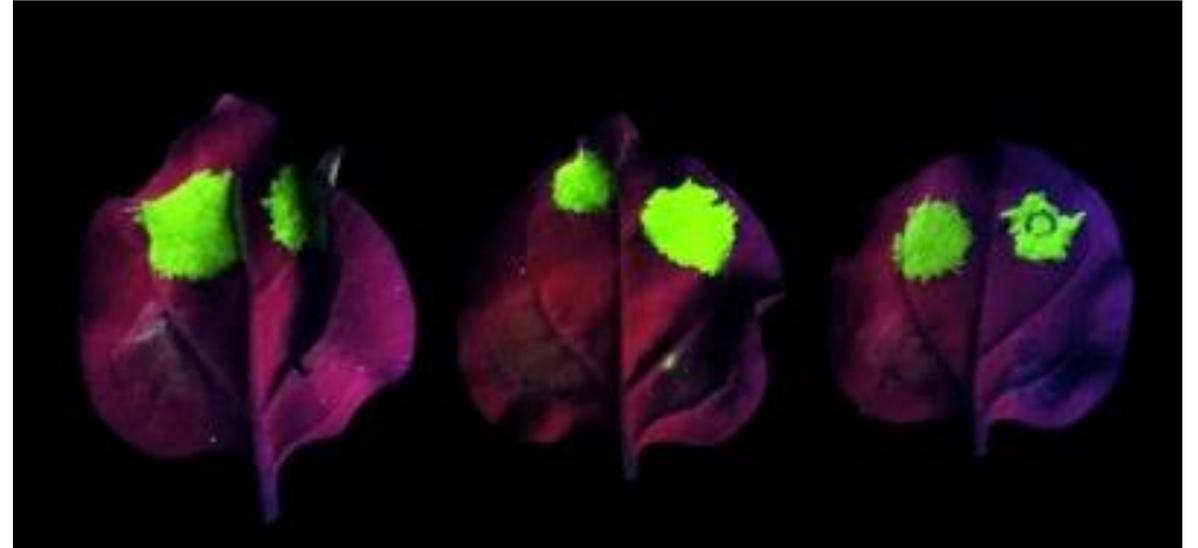


## Modificación del plásmido Ti

### *Agrobacterium tumefaciens*

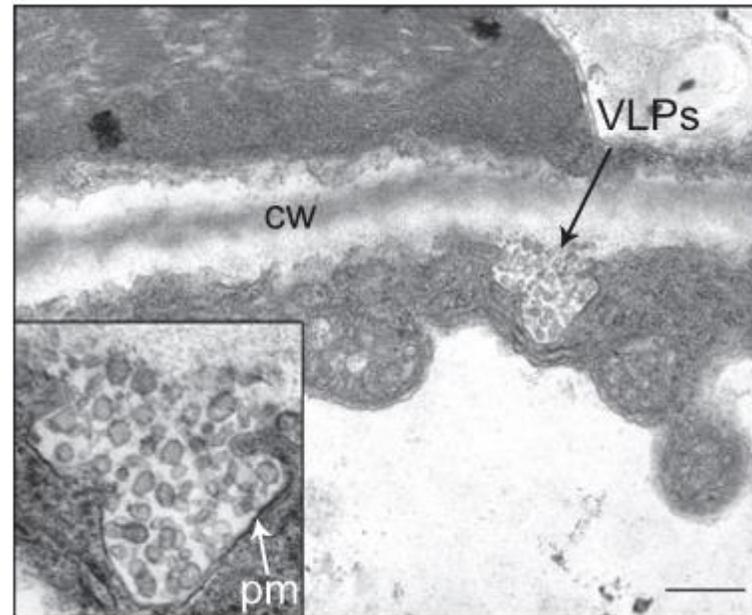
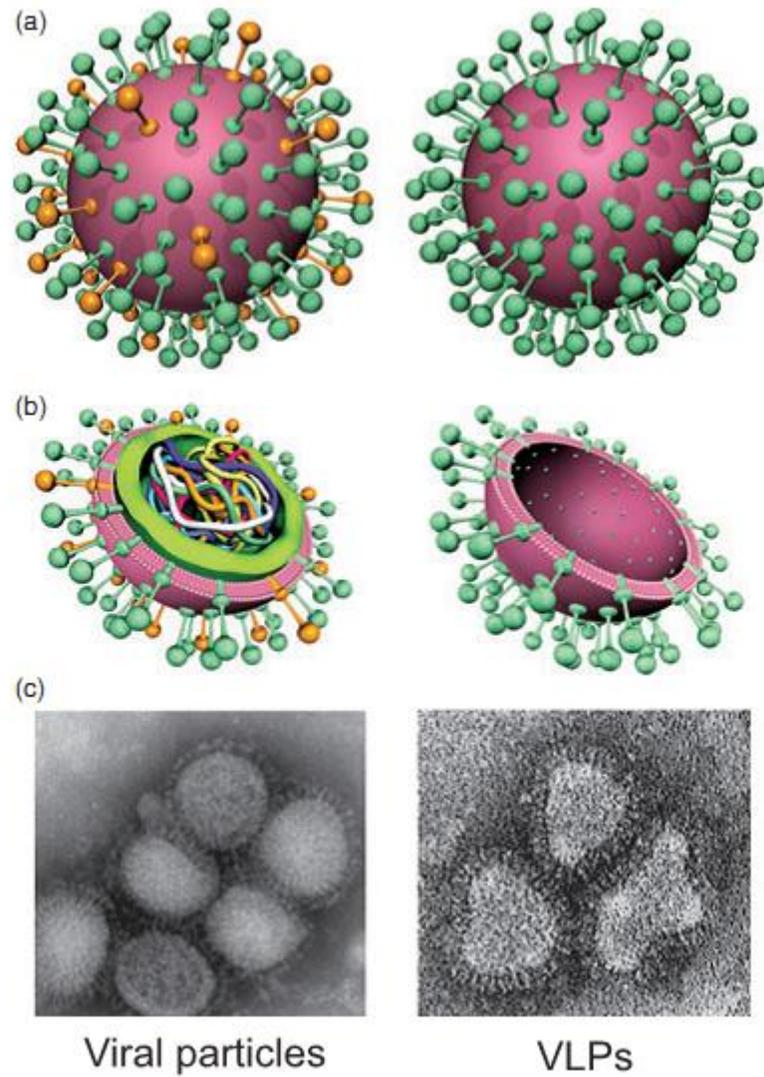


# Agroinfiltración

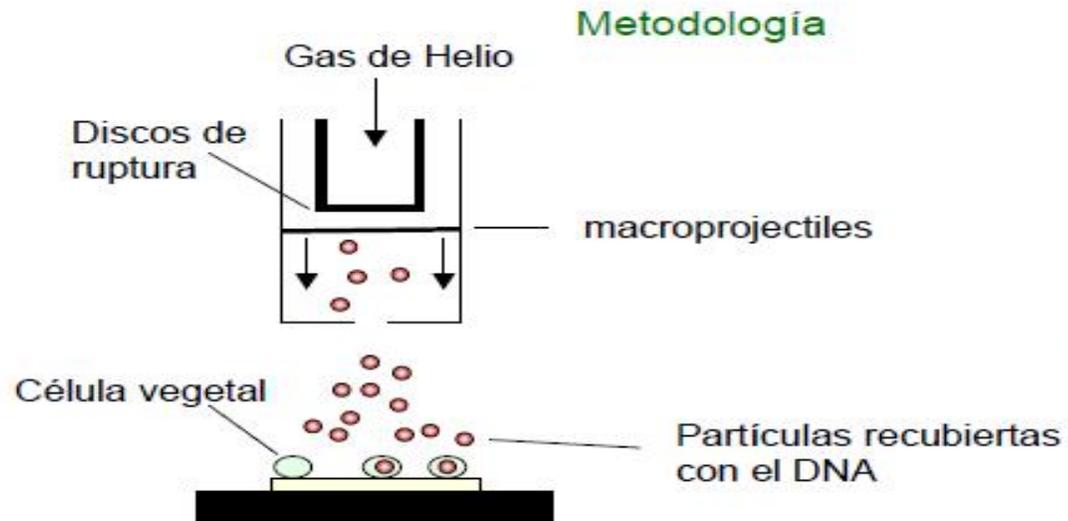


Expresión transitoria: el transgén no es heredable

Producción de vacunas en plantas

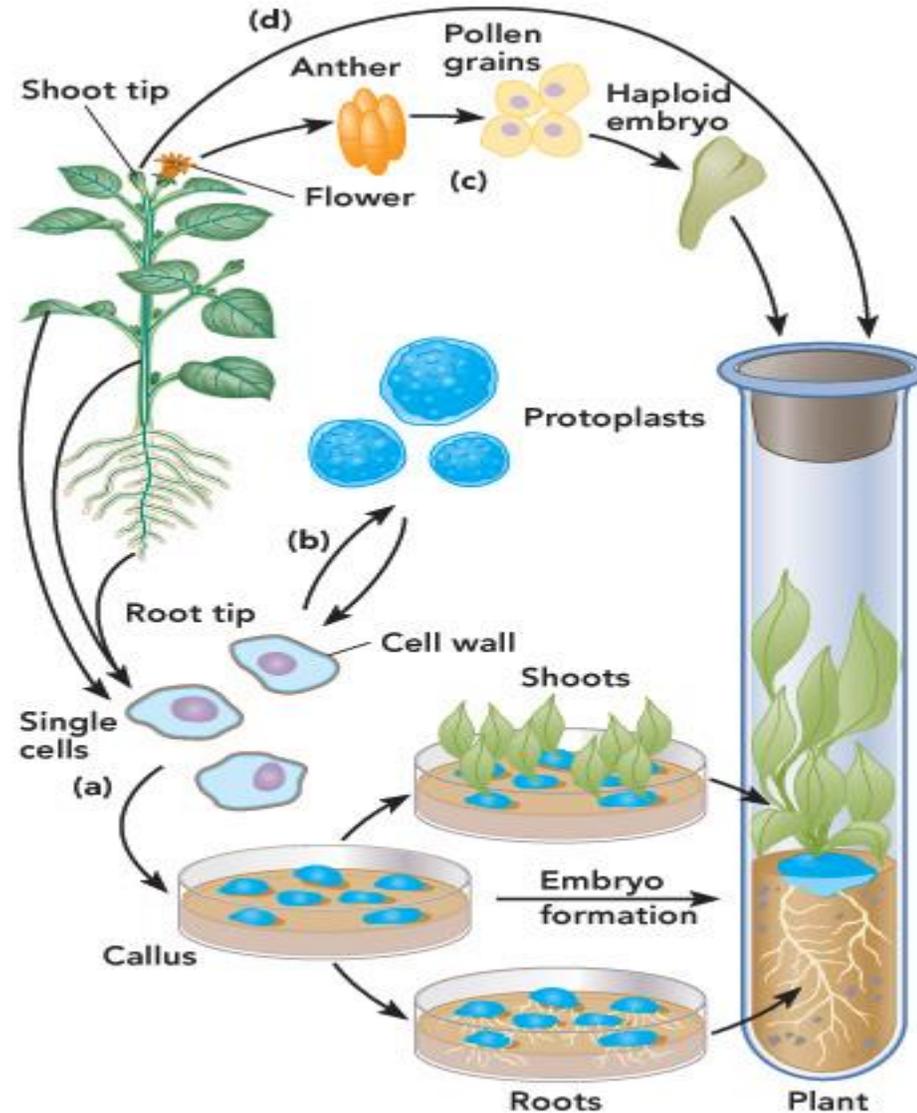


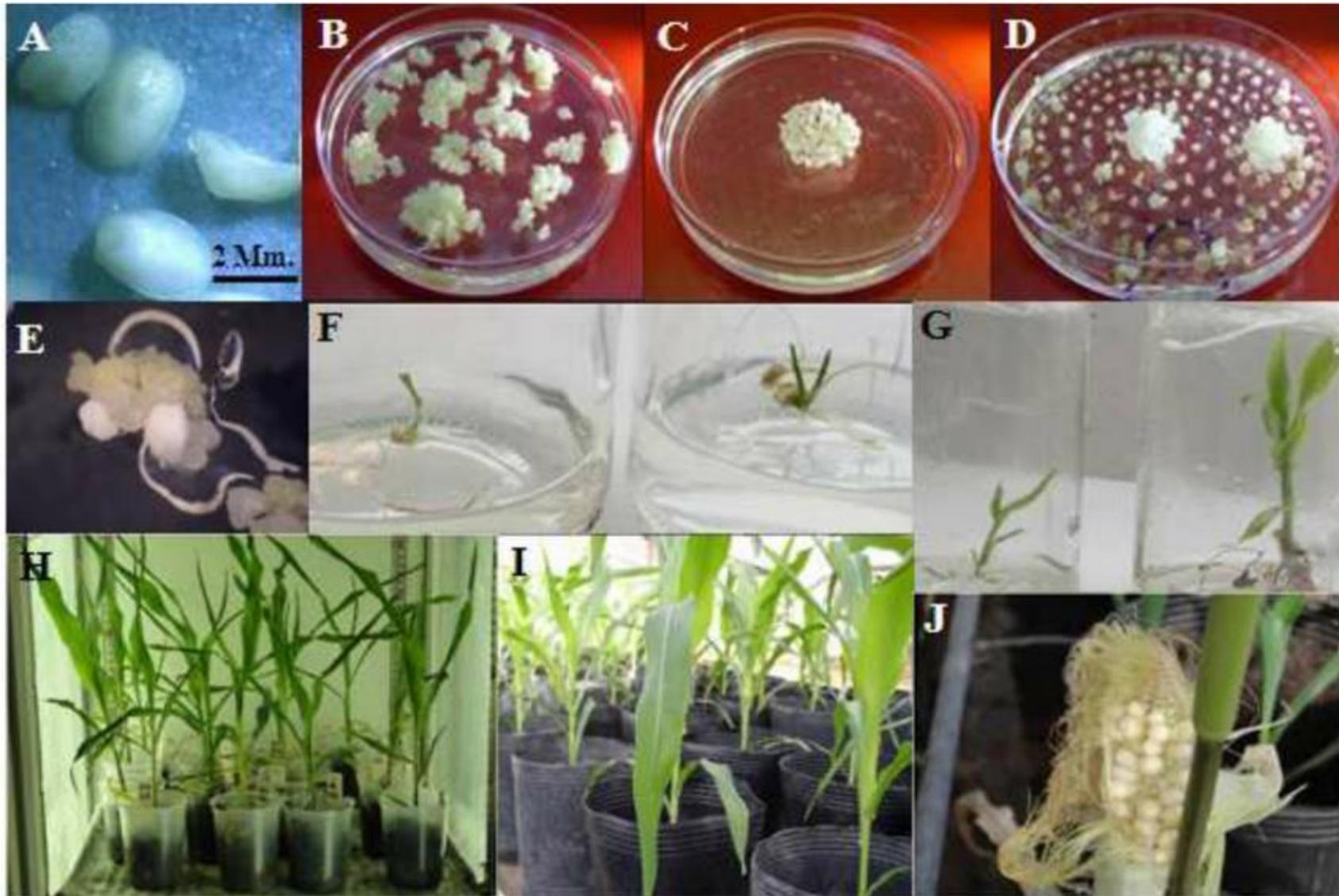
### 3. Bombardeo de partículas usando una pistola de genes que usa Helio



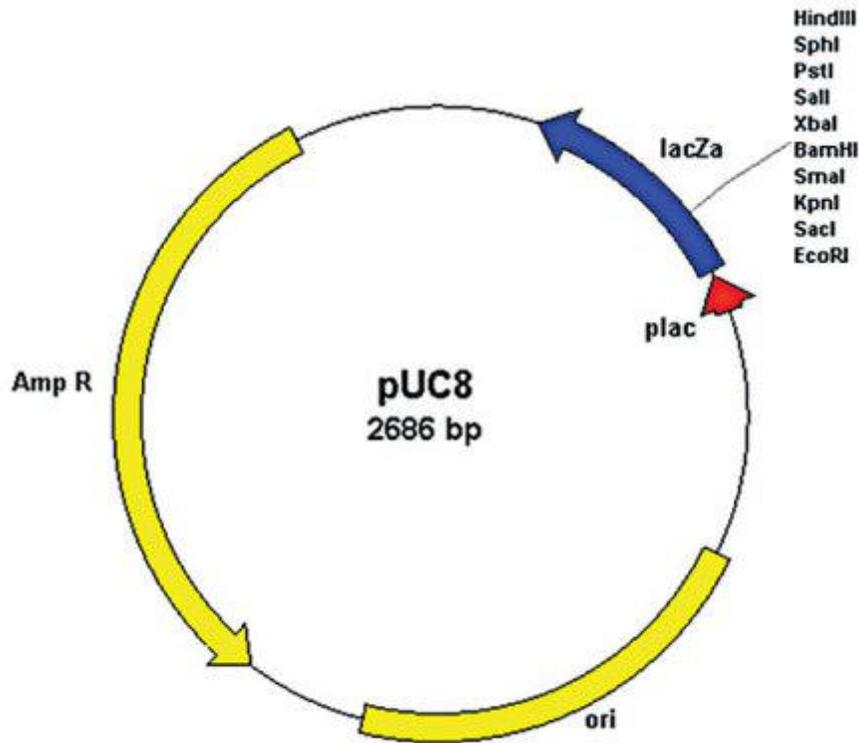
1. Bombardeo de células con partículas de oro
2. Detectar actividad con proteínas marcadoras

# Se puede regenerar plantas enteras mediante el cultivo de células y tejido





**Trigo HB4**

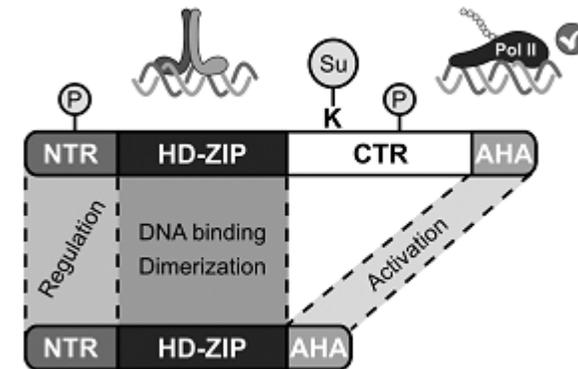


Promotor y primer intron de la ubiquitina de maíz.

Secuencia codificante de HaHB4.2

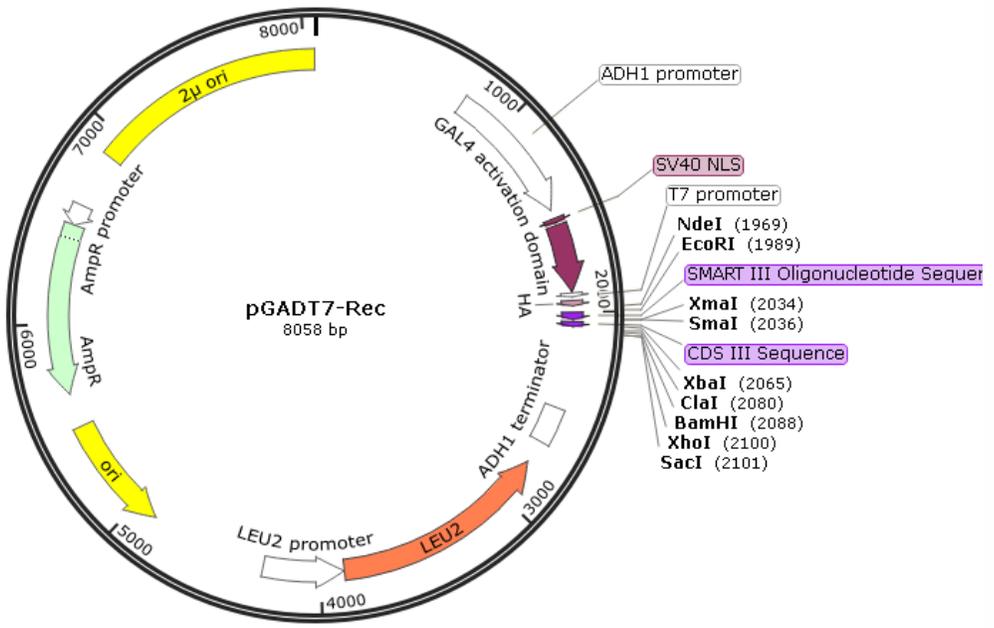
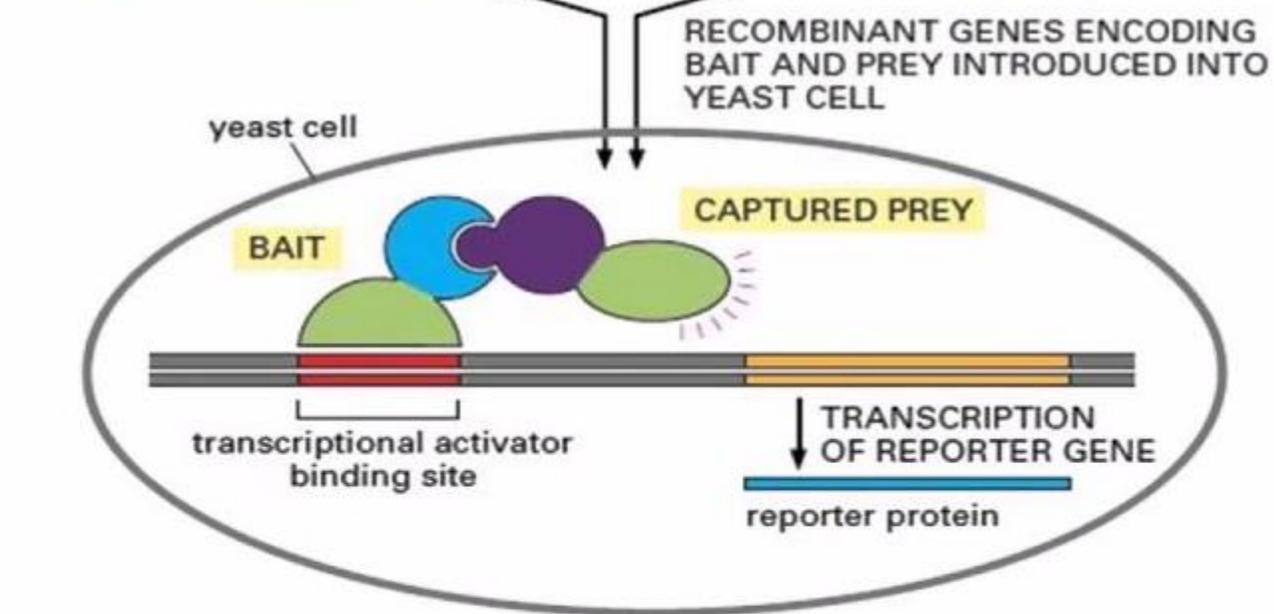
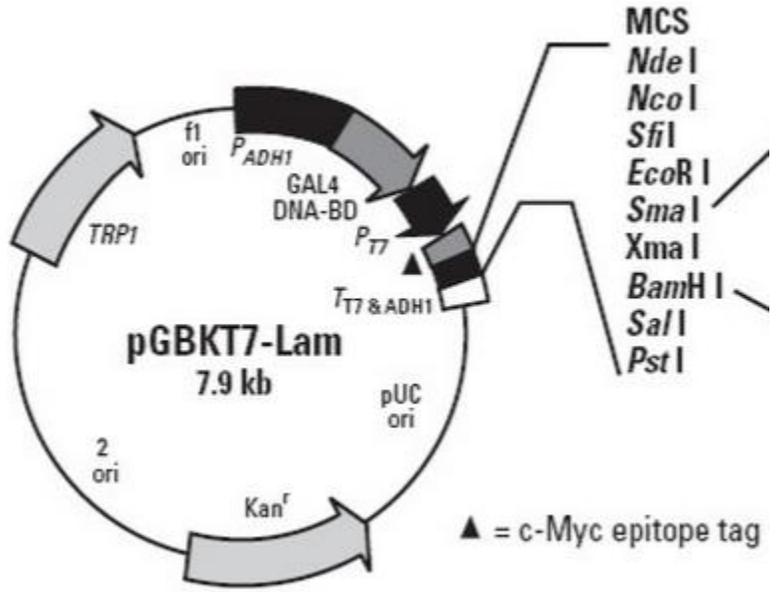
Terminador de la nopalina sintetasa de *A. tumefaciens*,  
Incluyendo la señal de poliadenilación.

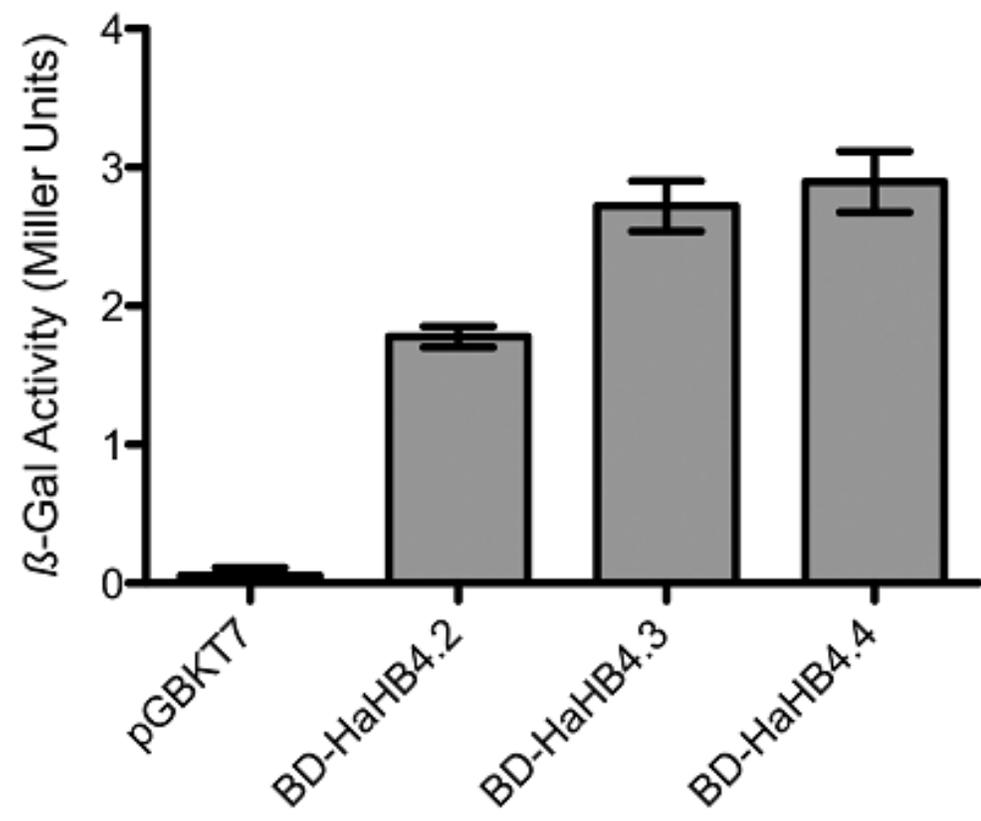
Conventional HD-Zip I

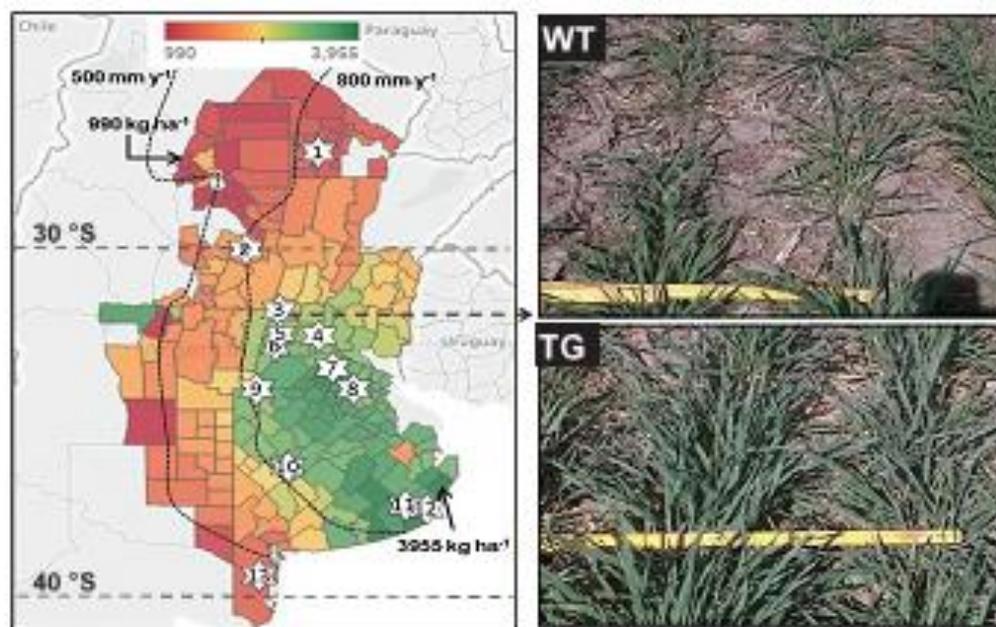
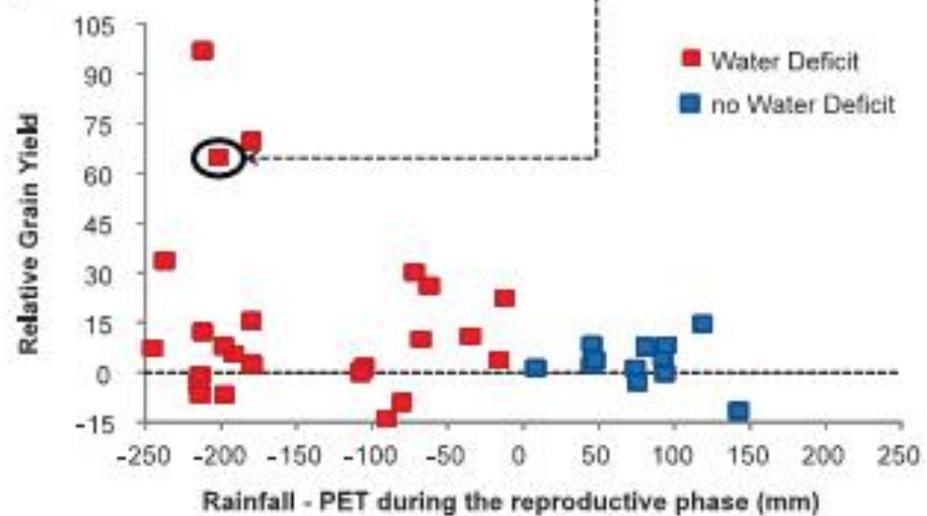


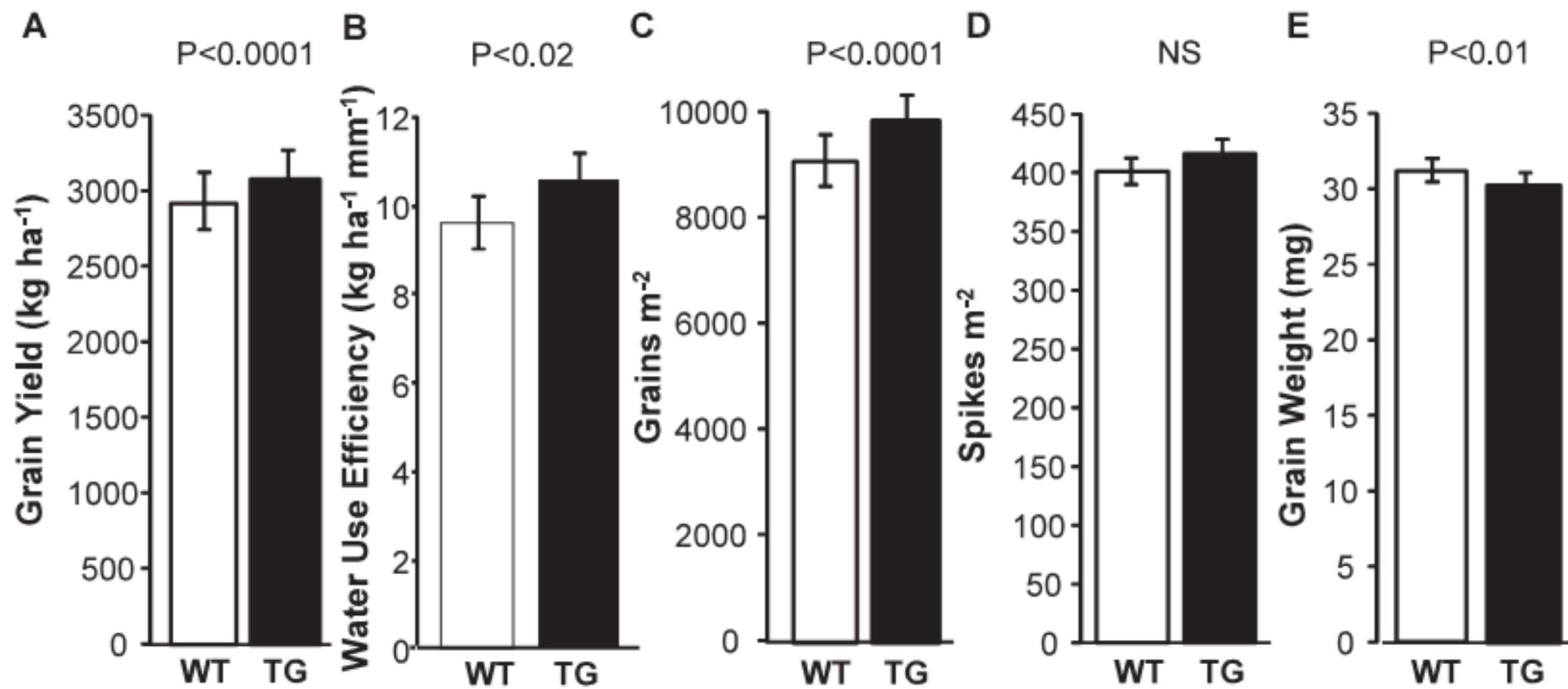
HaHB4

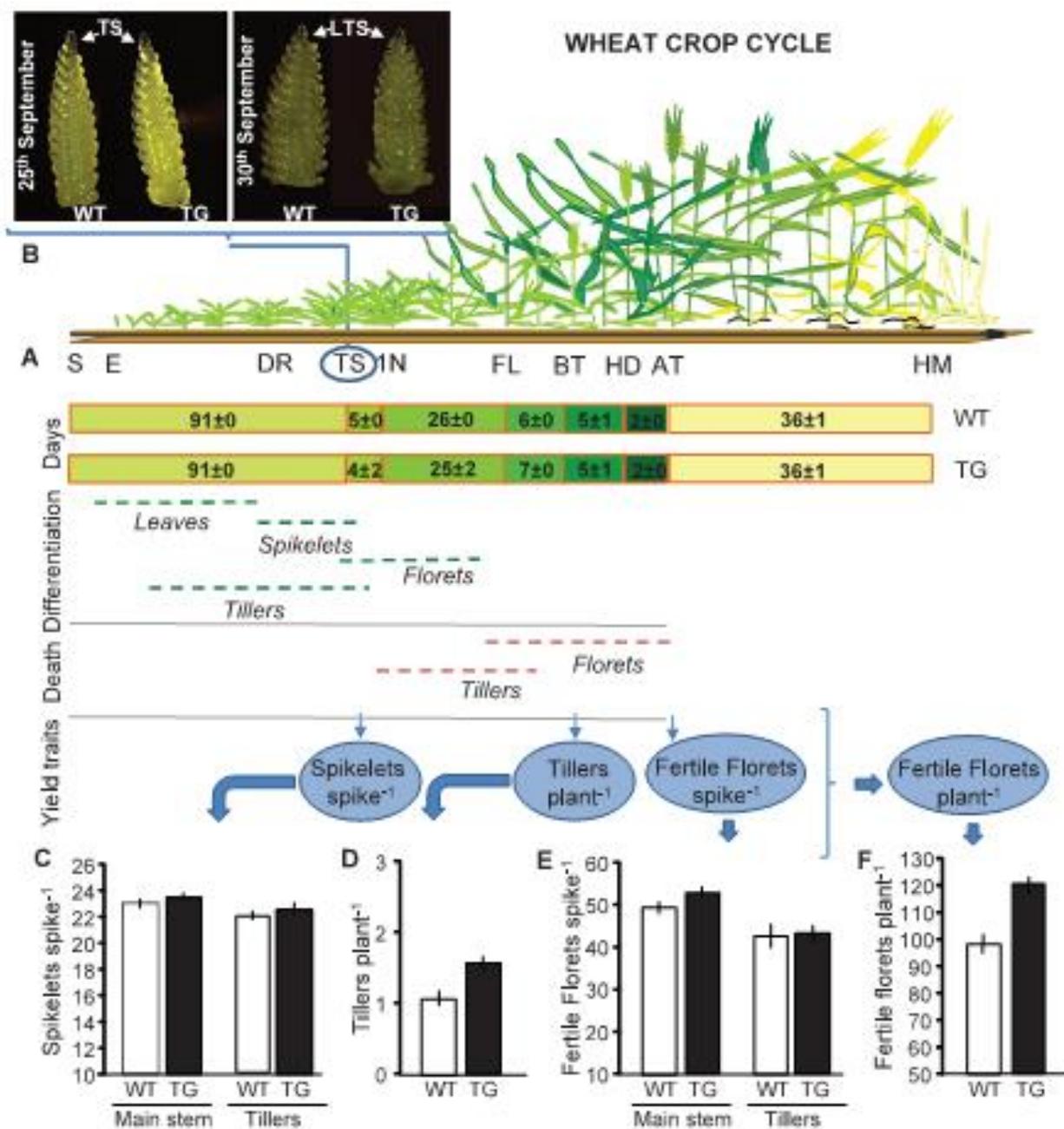
# Yeast Two Hybrid System

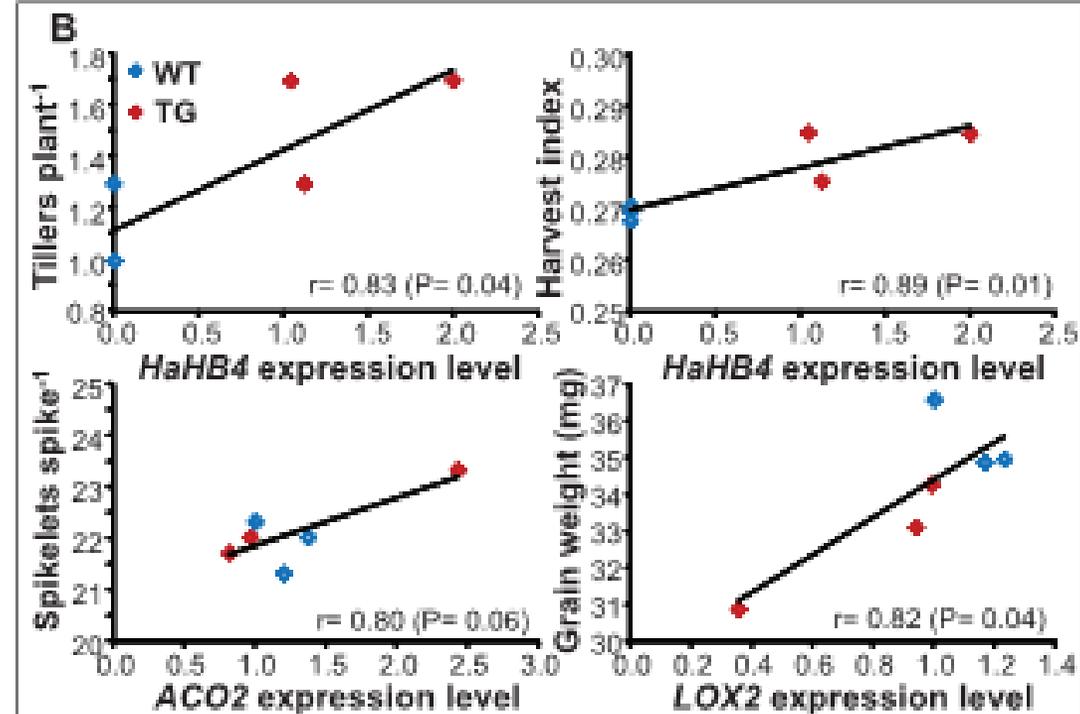
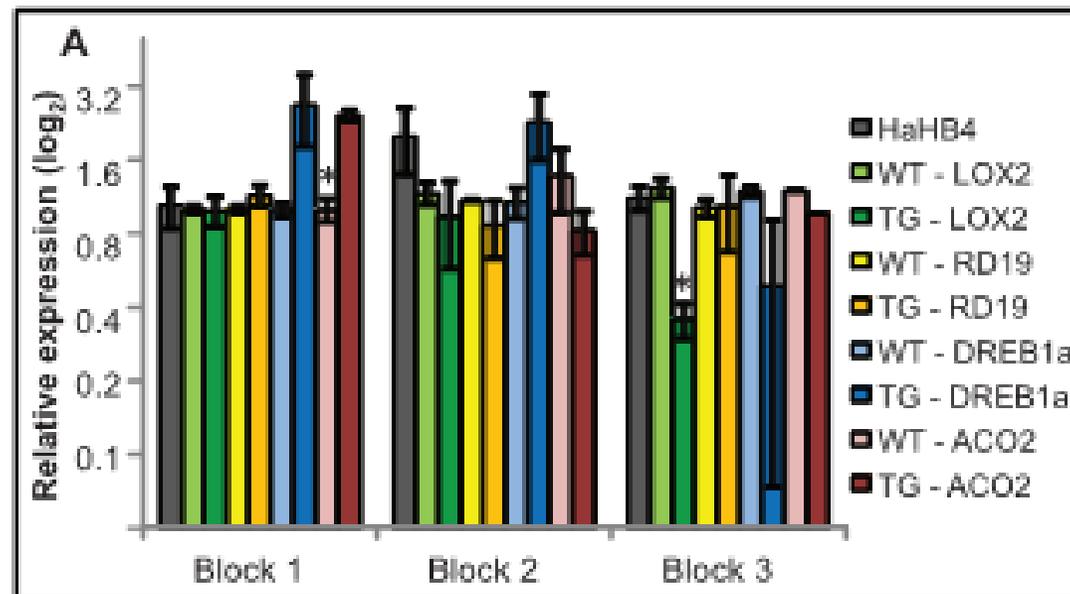




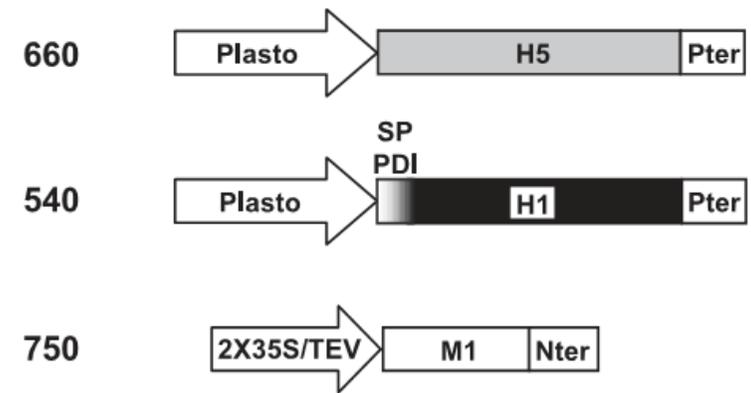
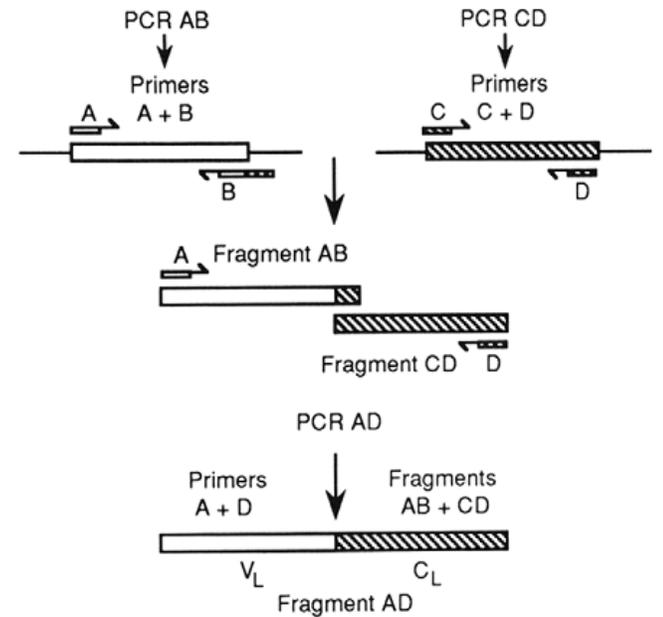
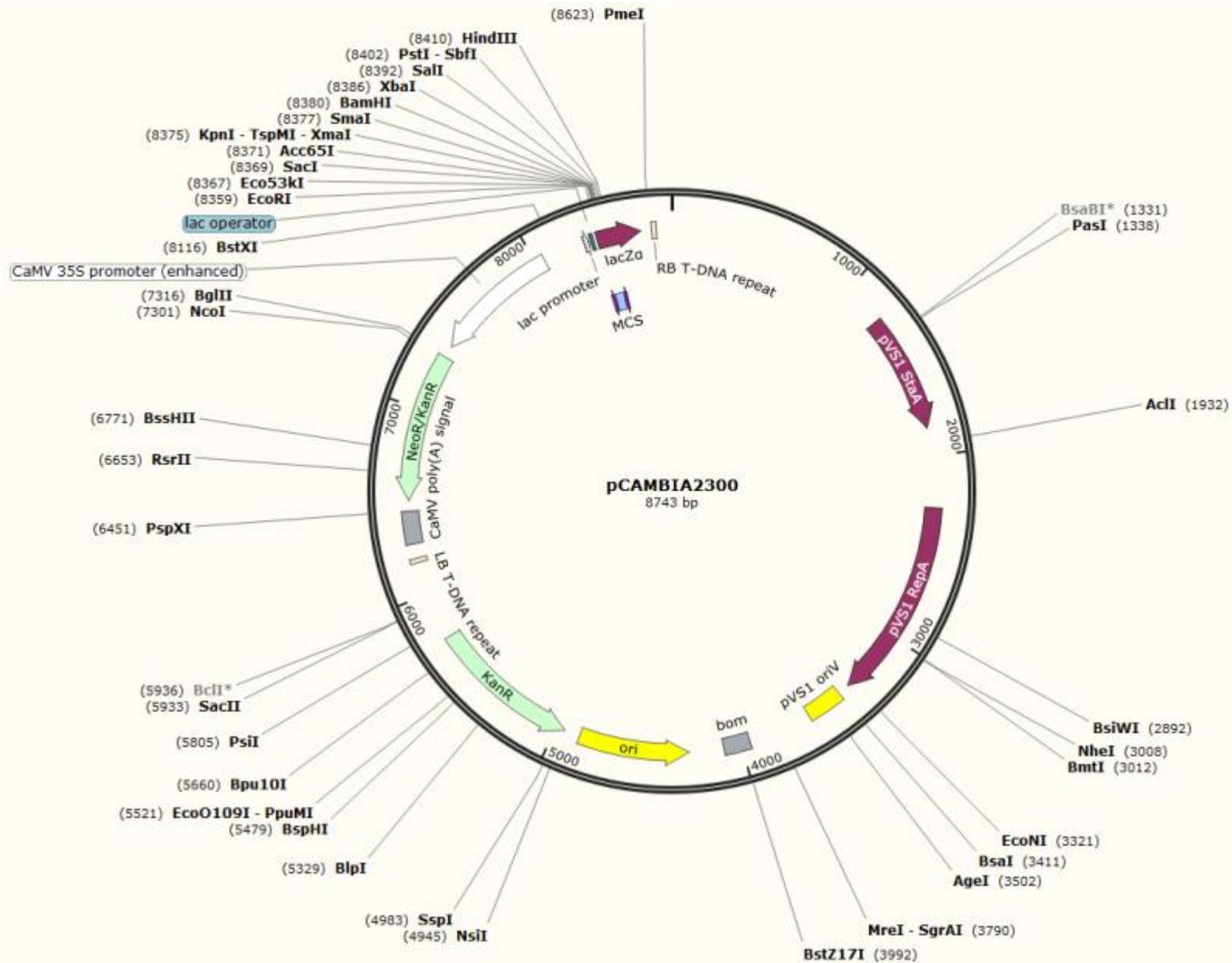
**A****B**





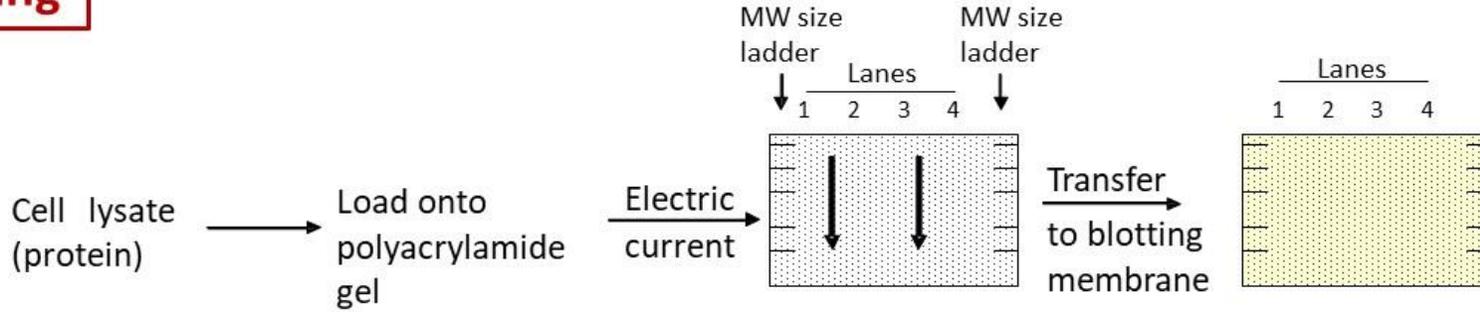


# **Vacuna contra la gripe producida en plantas**

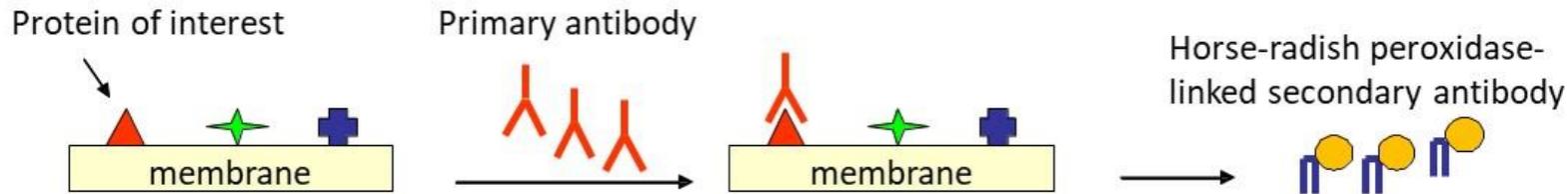


# Western blotting

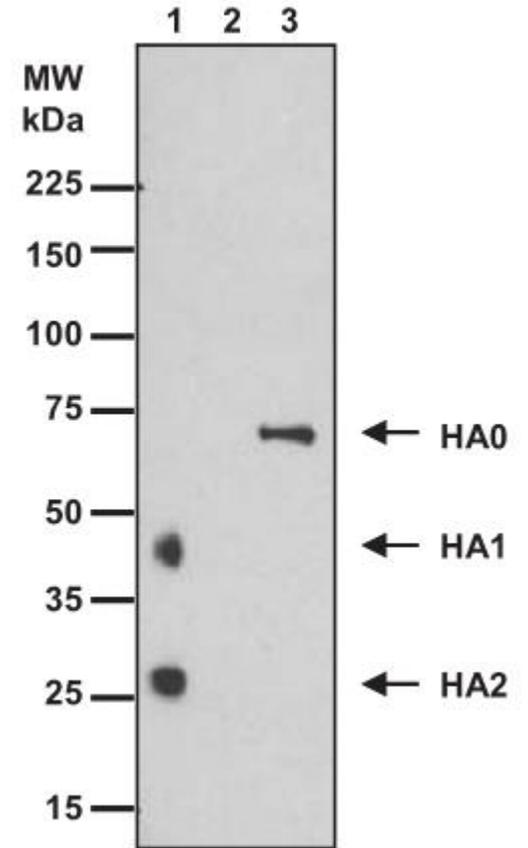
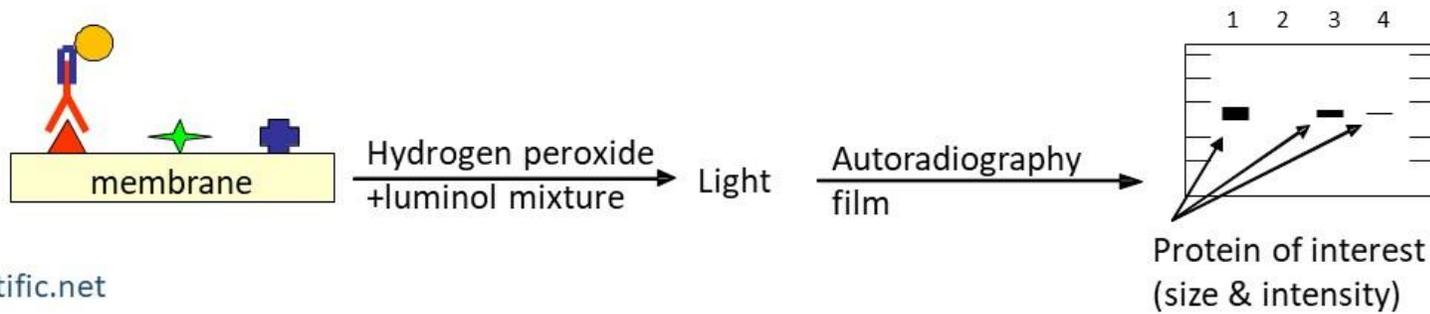
## 1. Gel loading + protein transfer

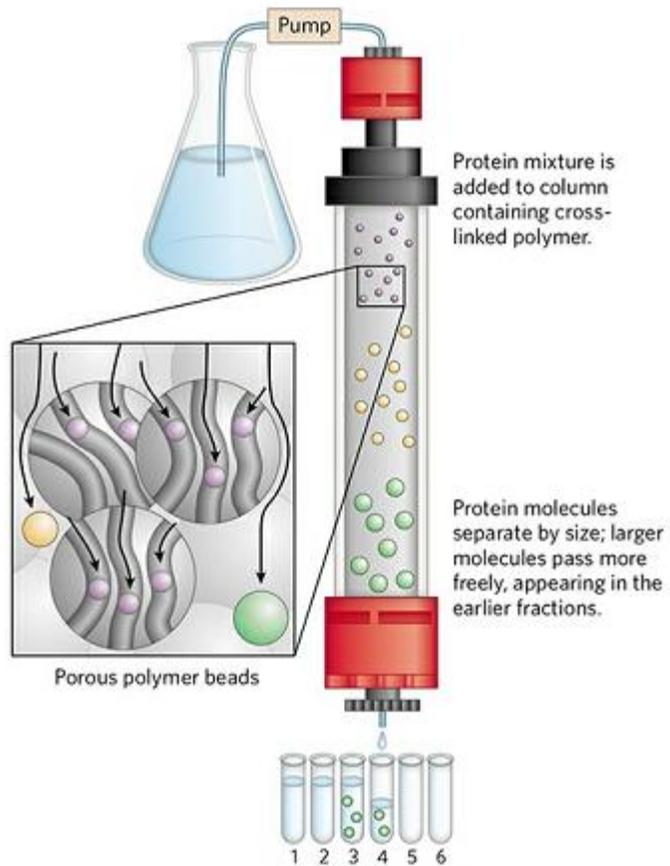


## 2. Antibody binding to protein of interest

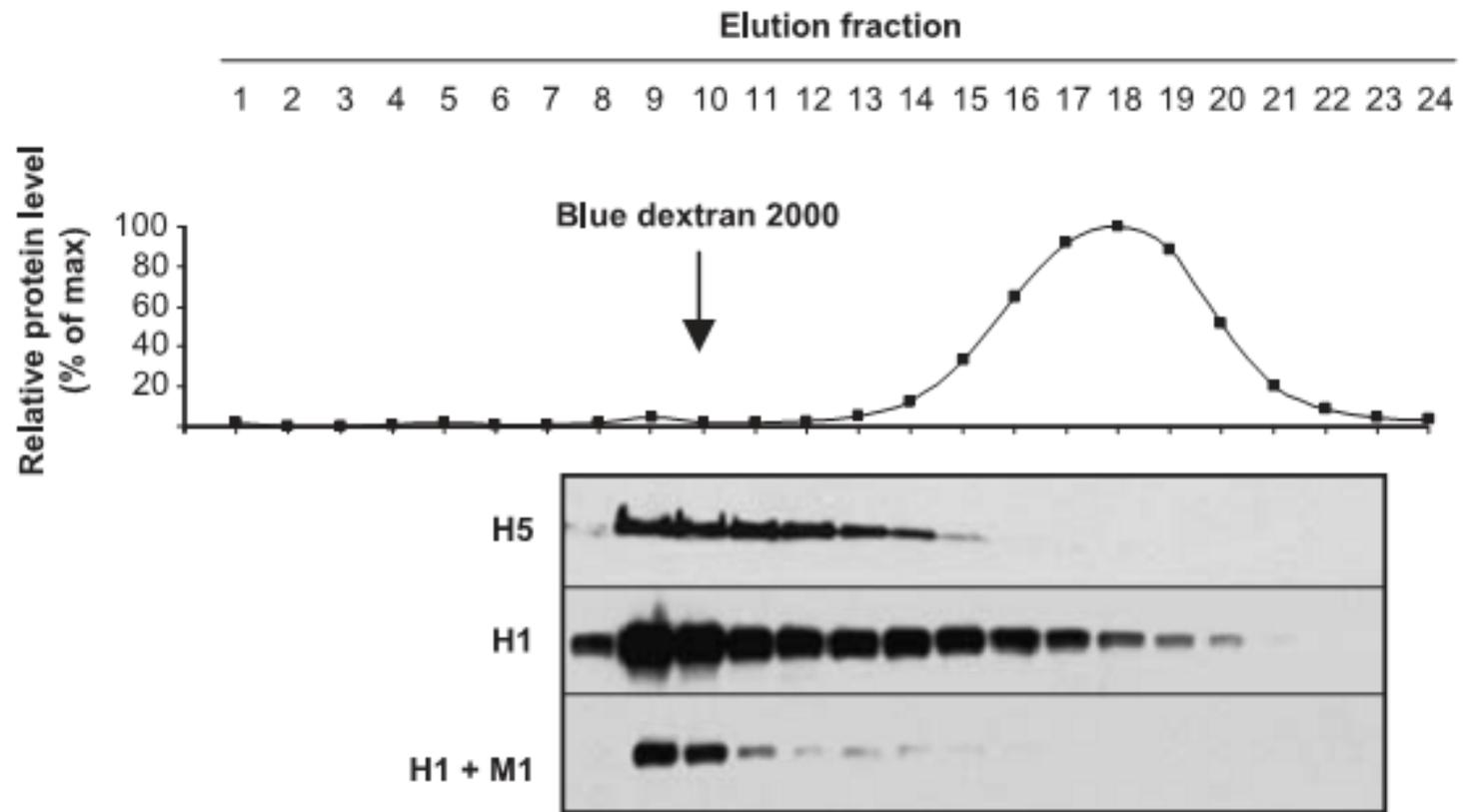


## 3. Protein detection

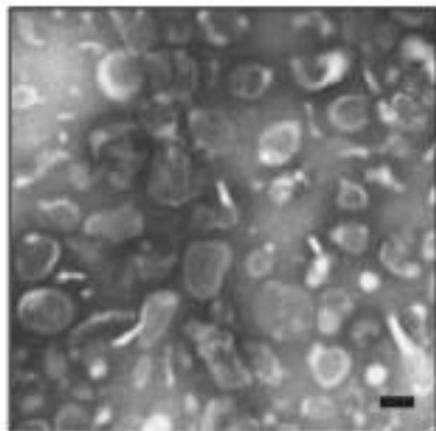




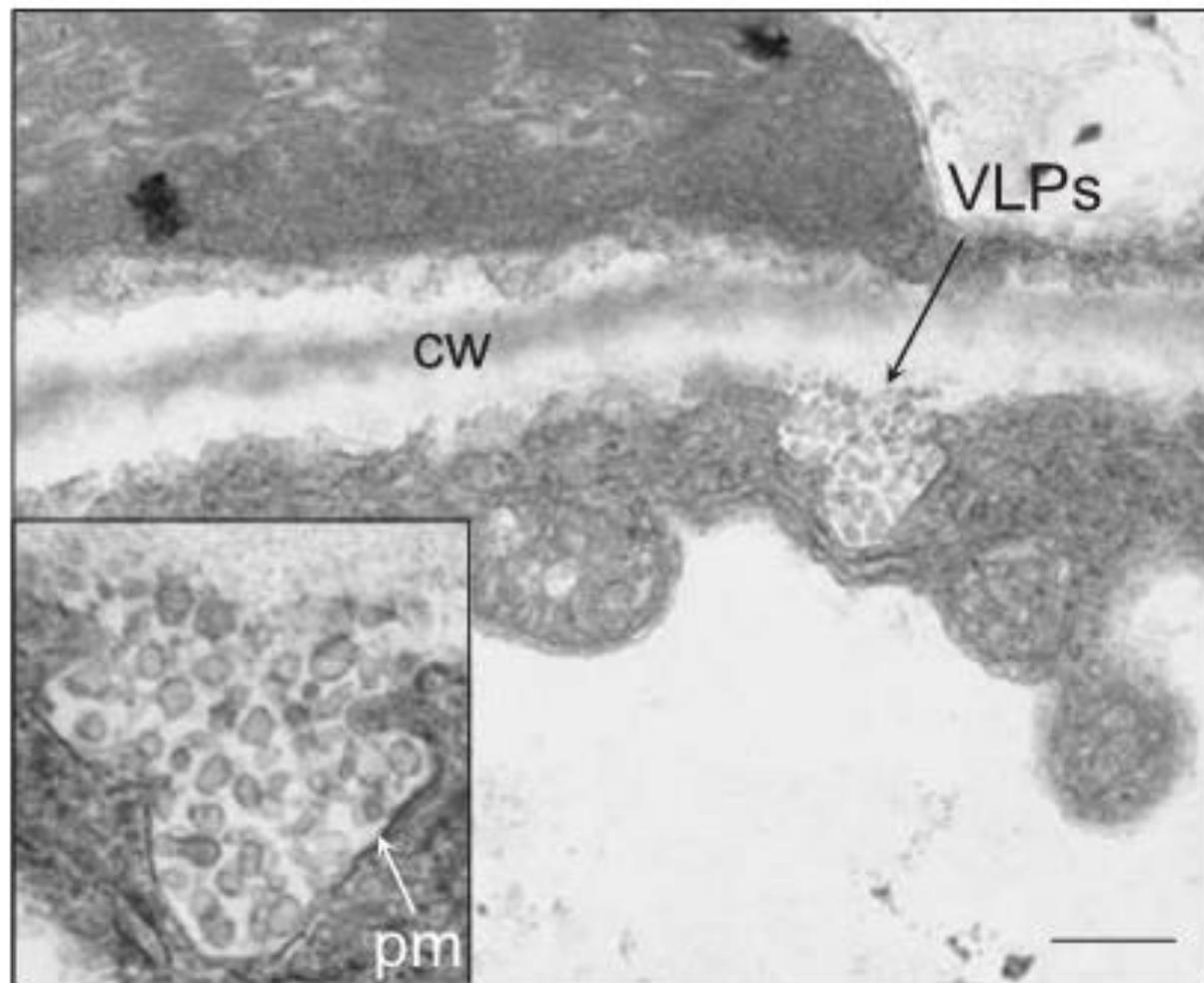
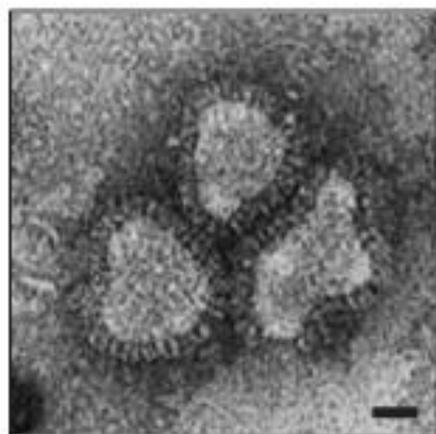
(b) Size-exclusion chromatography



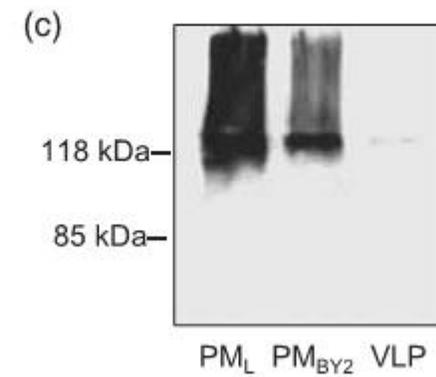
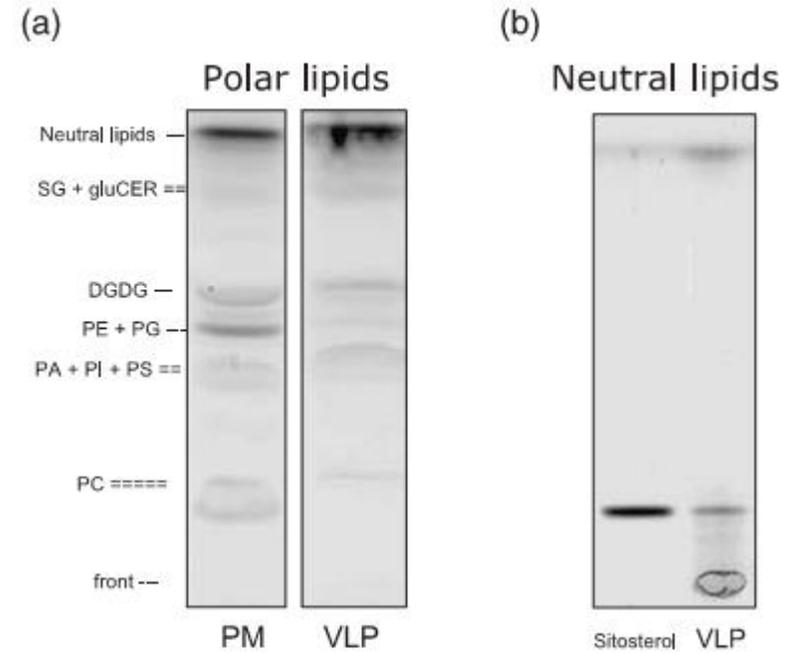
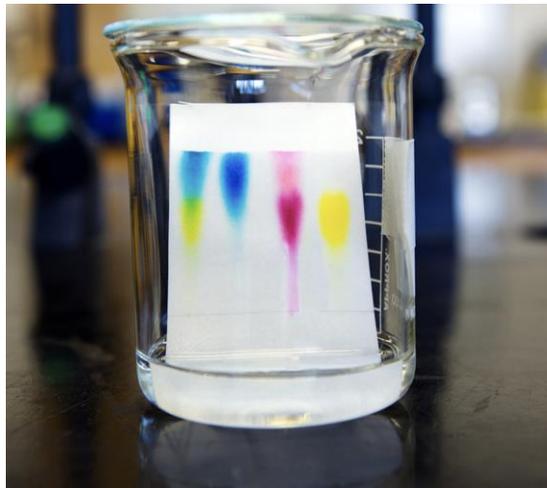
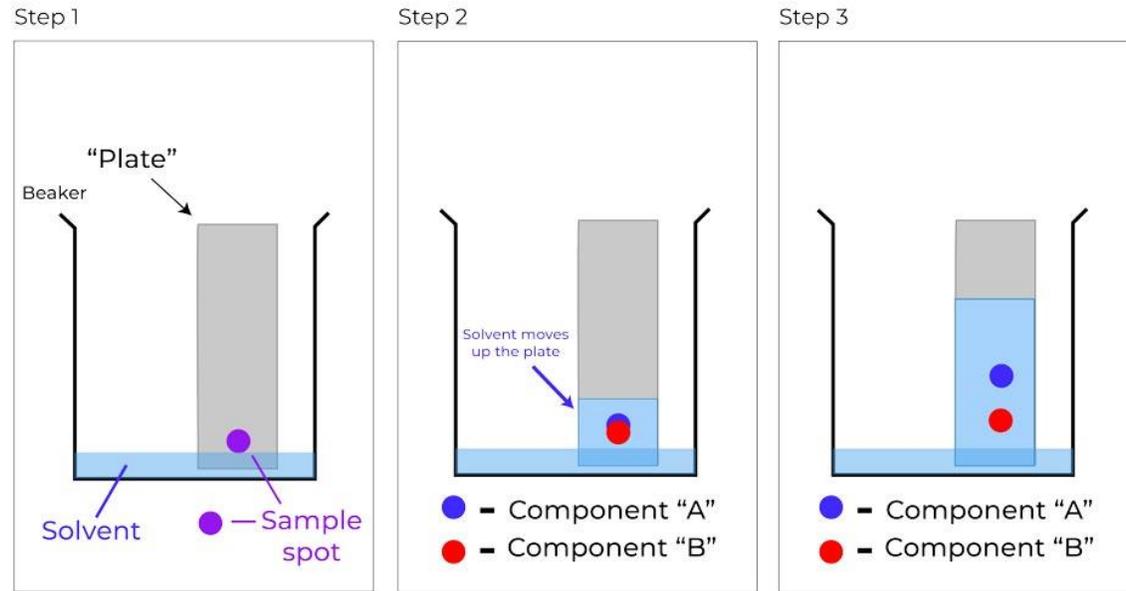
(a)

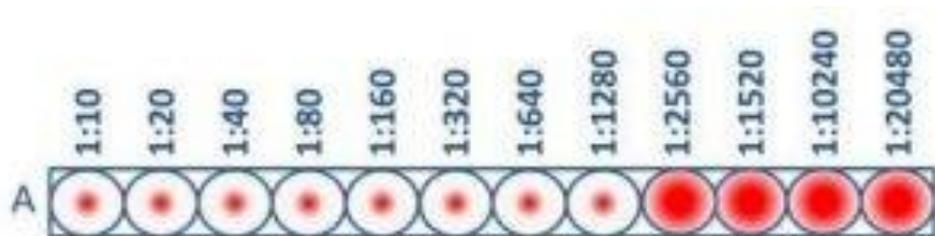
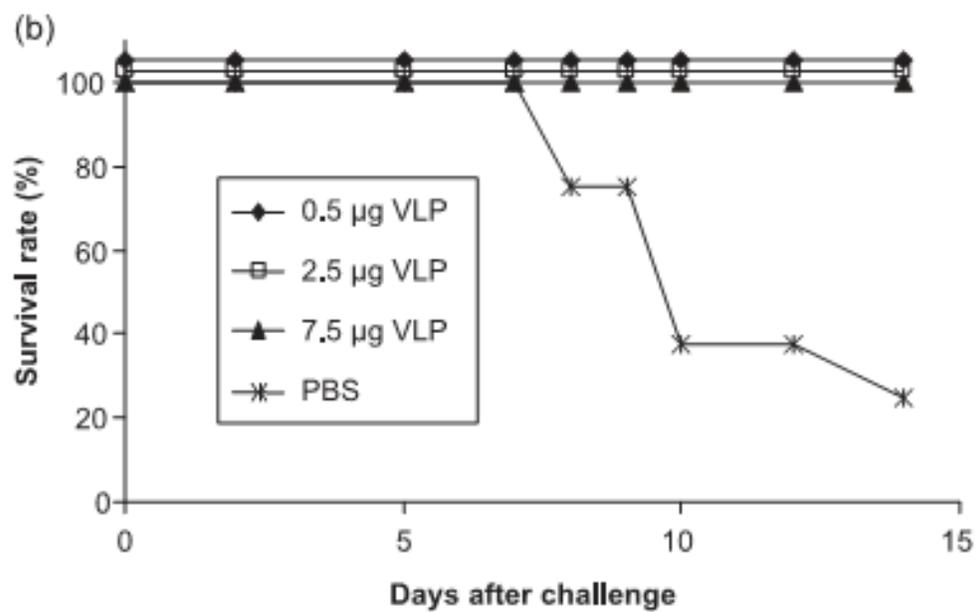
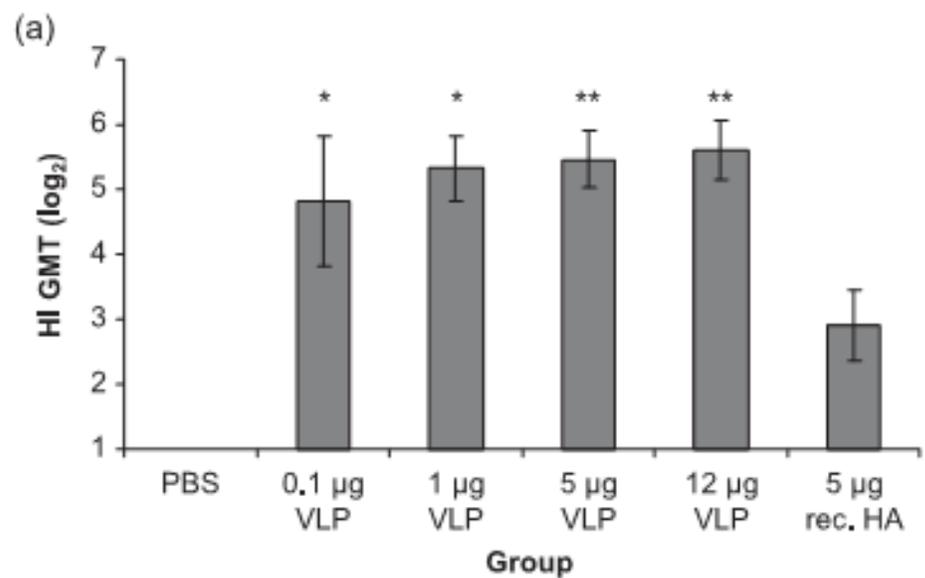
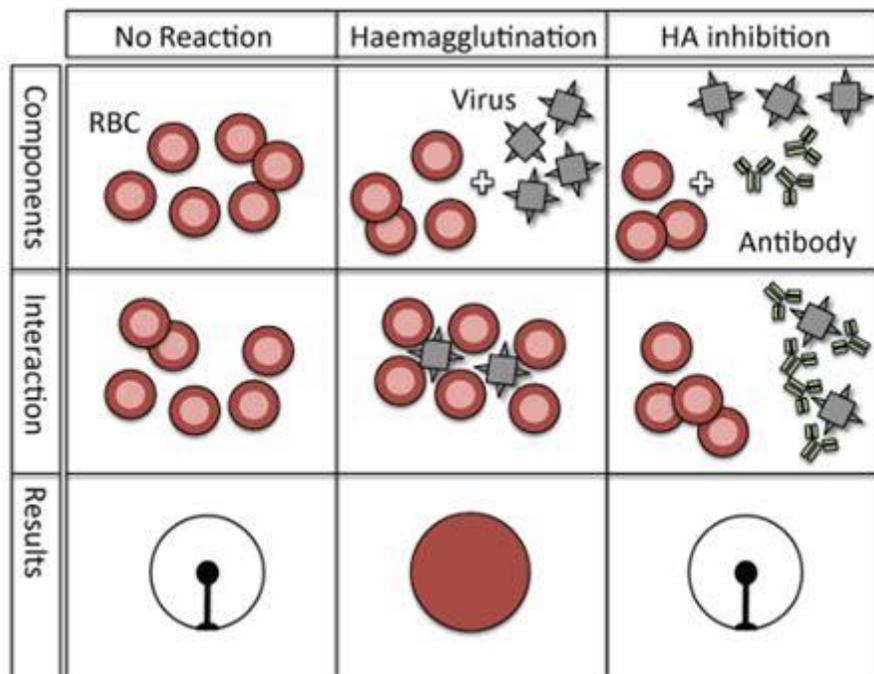


(b)



## Thin-Layer Chromatography





# **Bioseguridad, análisis de riesgo y autorización para la liberación de OGM**

# Organismo Genéticamente Modificado (OGM)

Según el **Protocolo de Cartagena**, un OGM es todo organismo vivo que posea una nueva combinación de material genético obtenida mediante la aplicación de la biotecnología moderna.

**Biotecnología moderna:** la aplicación de: técnicas *in vitro* de ácido nucleico, incluidos el ácido desoxirribonucleico (ADN) recombinante y la inyección directa de ácido nucleico en células u orgánulos, o la fusión de células más allá de la familia taxonómica, que superan las barreras fisiológicas naturales de la reproducción o de la recombinación y que no son técnicas utilizadas en la reproducción y selección tradicional.

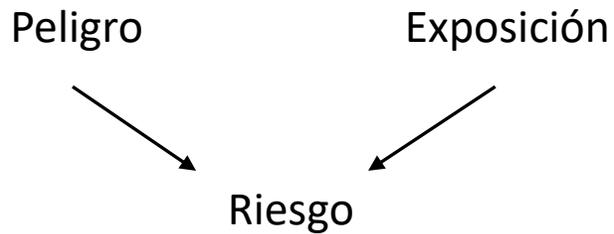
La nueva resolución incluye la definición de **nueva combinación de material genético** que se refiere a cualquier cambio producido en el genoma del organismo por la incorporación, de forma estable y cohesionada, de uno o varios genes o secuencias de ácido nucleico que forman parte de una construcción genética definida.

La Comisión Nacional Asesora de Biotecnología Agropecuaria (CONABIA) regula las actividades relacionadas con OGM de uso agropecuario, constituyéndose como instancia de evaluación y consulta. Su misión es garantizar la bioseguridad del agroecosistema.



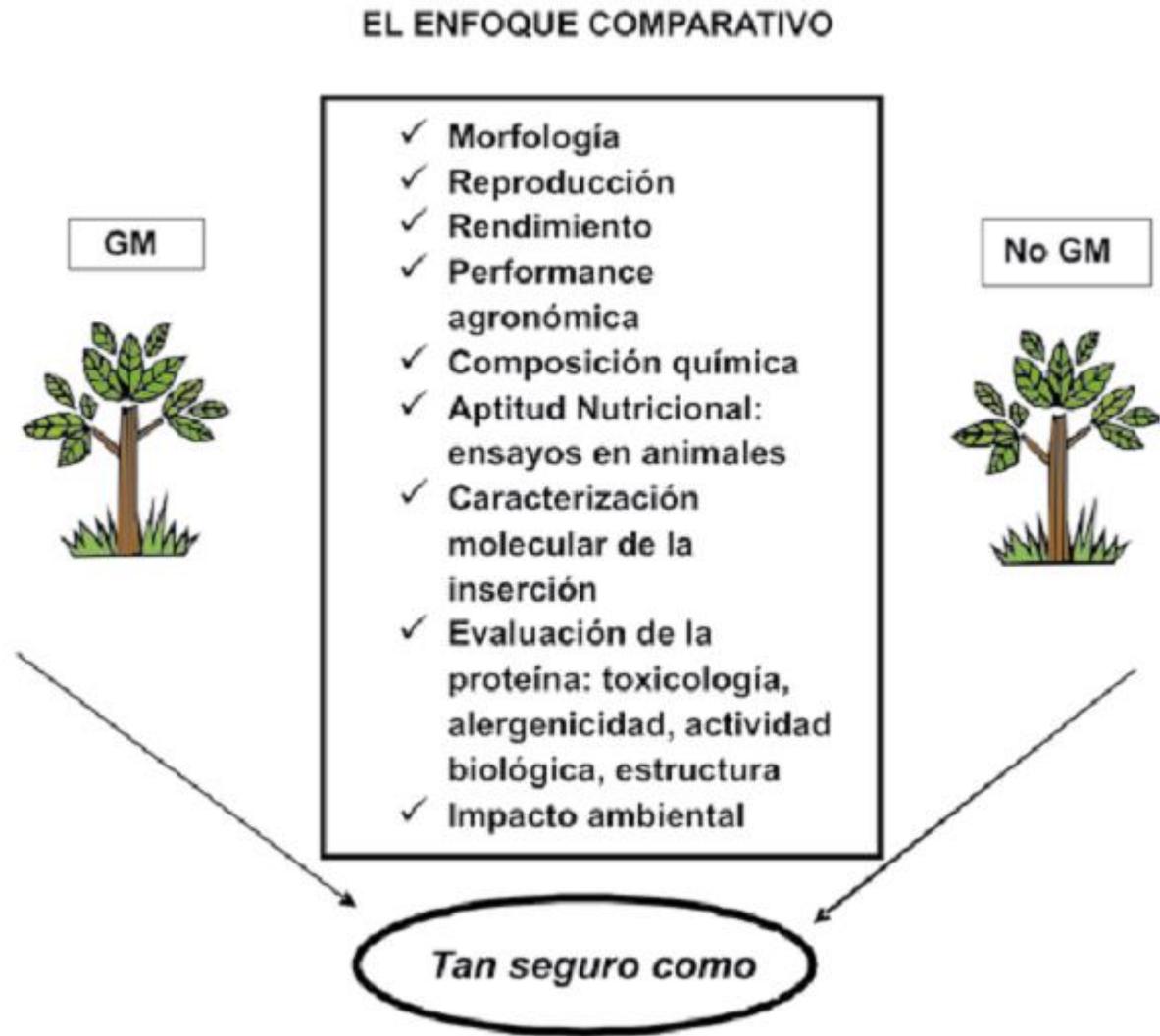
## **Para que un OGM sea aprobado, debe llegarse a las siguientes conclusiones:**

- > que es tan seguro como y no menos nutritivo que su contraparte no transgénica
- > que no se hayan generado o introducido nuevos alérgenos, toxinas o antinutrientes
- > que su desempeño agronómico sea similar a su contraparte convencional y sólo difiera en la característica introducida
- > que no se pueda convertir en una maleza
- > que no afecte organismos benéficos (ej: abejas, otros polinizadores, otros insectos)
- > que la característica introducida no se transfiera a otras especies
- > que sea inocuo para las personas y los animales



Evaluación de seguridad o inocuidad por comparación con el no-transgénico

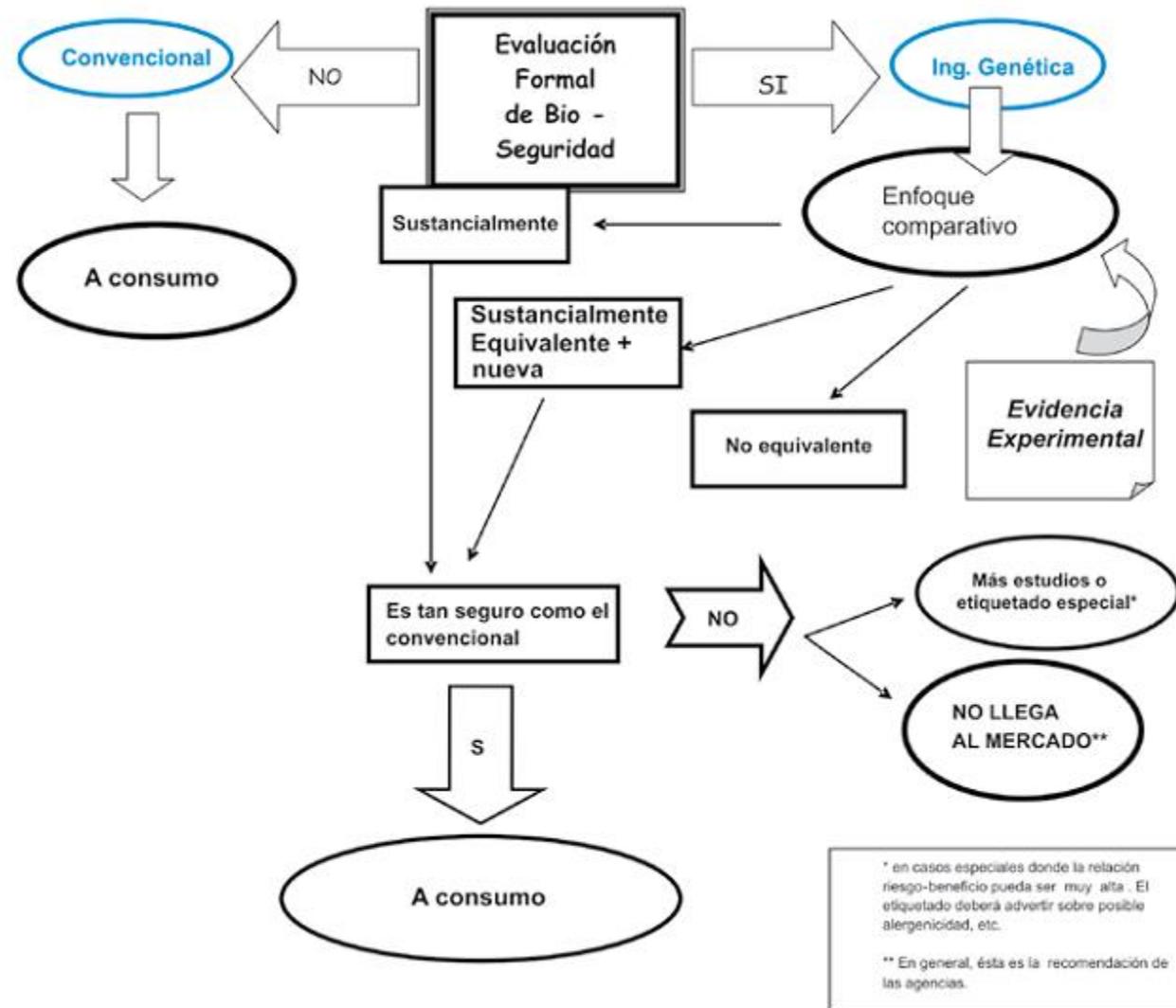
**Principio precautorio:** La falta de conocimientos científicos o de consenso científico no se interpretarán necesariamente como indicadores de un determinado nivel de riesgo, de la ausencia de riesgo, o de la existencia de un riesgo aceptable.



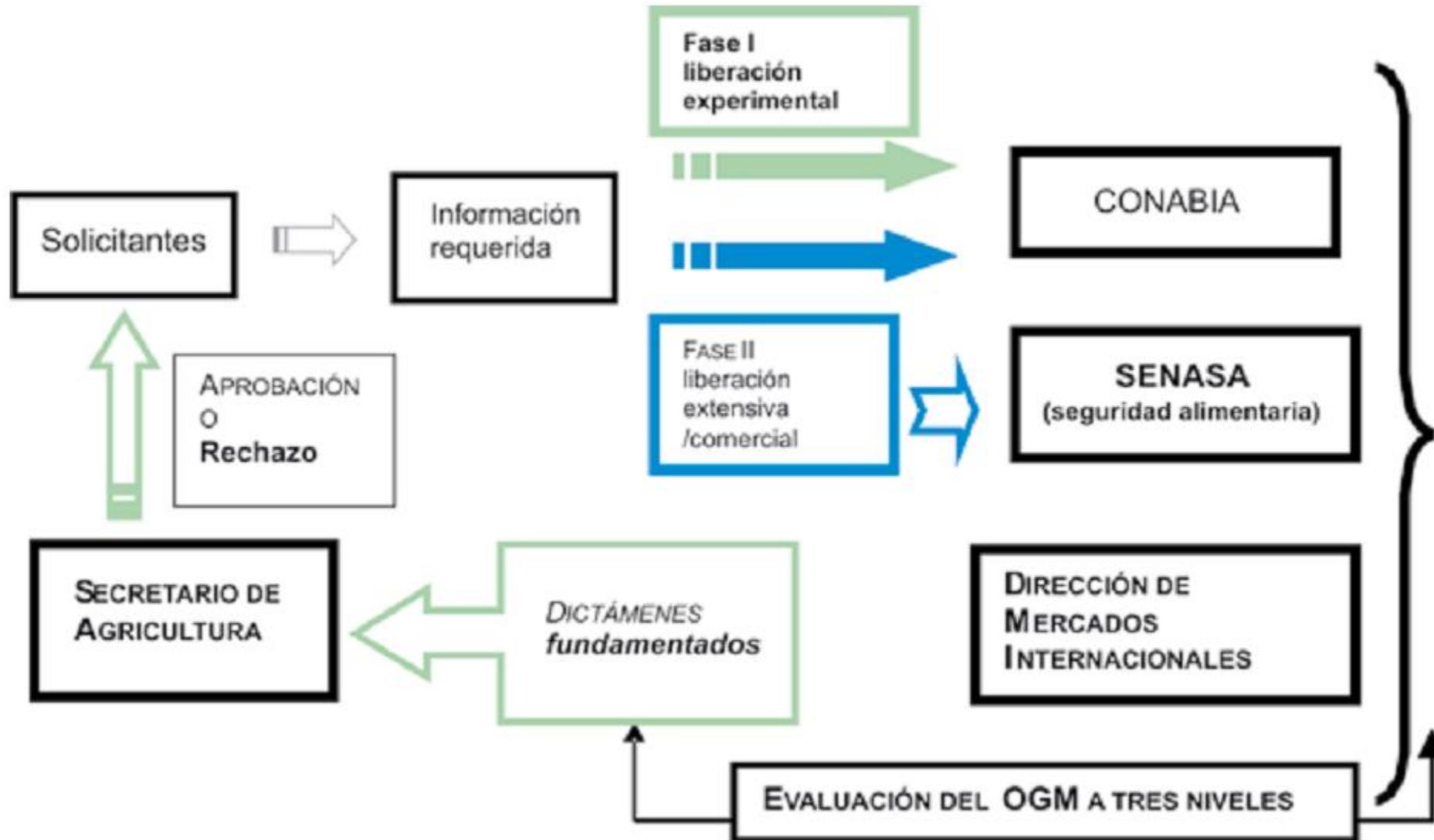
## **Etapas del análisis de riesgo**

- a) Identificación de cualquier característica genotípica y fenotípica nueva relacionada con el organismo vivo modificado que pueda tener efectos adversos.
- b) Evaluación de la probabilidad de que esos efectos adversos ocurran realmente, teniendo en cuenta el nivel y el tipo de exposición del probable medio receptor al organismo vivo modificado
- c) Evaluación de las consecuencias si esos efectos adversos ocurriesen realmente.
- d) Estimación del riesgo general planteado por el organismo vivo modificado basada en la evaluación de la probabilidad de que los efectos adversos determinados ocurran realmente y las consecuencias en ese caso.
- e) Recomendación sobre si los riesgos son aceptables o gestionables o no, incluida, cuando sea necesaria, la determinación de estrategias para gestionar esos riesgos.
- f) Cuando haya incertidumbre acerca del nivel de riesgo, se podrá tratar de subsanar esa incertidumbre solicitando información adicional sobre las cuestiones concretas motivo de preocupación, o poniendo en practica estrategias de gestión del riesgo apropiadas y/o vigilando al organismo vivo modificado en el medio receptor.

Evaluación de riesgos, manejo de riesgos y comunicación de riesgos son tres etapas interdependientes que conforman el análisis de riesgo en su conjunto.



# Regulación y aprobación de OGM en Argentina



# **Evaluación de OGM**

Contenidos (p.ej. invernaderos, cámaras de cría)

Confinados (en parcelas experimentales)

**Invernaderos BS1 (nivel de bioseguridad 1):** Para especies que no son malezas y que no tienen posibilidad de cruzamiento con malezas locales

- Estructura: aluminio, acero galvanizado, madera, caño.
- Accesos: alambrado perimetral de la instalación o puerta principal de acceso, con acceso restringido al personal autorizado.
- Paredes: vidrio laminado o plástico rígido (policarbonato o similar).
- Mallas anti-insectos en aperturas: de 640 micrones de poro como máximo (40 mesh como mínimo).
- Ventilación: aperturas laterales y/o cenitales cubiertas con mallas, ventiladores, extractores y pantallas de evaporación.
- Pisos: preferentemente de material (cemento, baldosas); pasillos y caminos internos de material.
- Banquinas: de material resistente al agua y a los productos químicos utilizados.
- Drenajes: hacia la red sanitaria o pozo.
- Rejillas: con mallas para impedir la entrada de animales y el escape de semillas.

**Invernaderos BS2 (nivel de bioseguridad 2):** Para especies que tienen posibilidad de cruzamiento con malezas locales

Deberán contar con las mismas características que BS1, adicionando doble puerta de acceso y pisos, pasillos y caminos internos necesariamente de material (cemento y baldosas).

# Confinamiento en parcelas

Especie	Distancia aislamiento	de	Duración del Período control postcosecha
Alfalfa	2000m		4 años
Alfalfa (bajo jaula de malla antiáfidos o corte periódico de flores)	200m		4 años
Algodón	500m		3 años
Algodón (bajo carpa antiáfidos o embolsado individual)	200m		3 años
Arroz	150m		2 años
Caña de azúcar	15m		1 año

Cártamo	100m	2 años
Maíz	250m	1 año
Papa	10 m	3 años
Soja (cosecha manual )	3 m	1 año
Soja (cosechadora autopropulsada convencional )	30 m	1 año
Soja (cosechadora autopropulsada tipo experimental) (*)	15m cabecera 10m laterales	1 año
Tabaco	450 m	2 años
Trigo (cosecha manual)	3 m	2 años
Trigo (cosechadora autopropulsada convencional)	30 m	2 años
Trigo (cosechadora autopropulsada tipo experimental) (*)	15m cabecera 10m laterales	1 año

(\*) Se evaluará caso a caso si la cosechadora autopropulsada presentada puede o no ser considerada como de tipo experimental.

## Eventos aprobados por la CONABIA para su comercialización

Cultivo	Tolerancia a herbicidas	Resistencia a insectos	Ambas	Otros
Maíz	3	4	23	1 <sup>a</sup>
Soja	8	1	3	2 <sup>b,c</sup>
Algodón	2	2	3	
Papa				2 <sup>d</sup>
Alfalfa				1 <sup>e</sup>
Cártamo				1 <sup>f</sup>
Trigo				1 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>Resistencia a insectos y tolerancia a la sequía

<sup>b</sup>Tolerancia a herbicidas y a la sequía

<sup>c</sup>Tolerancia a herbicidas y alto contenido de ácido oleico

<sup>d</sup>Resistencia a virosis

<sup>e</sup>Tolerancia a herbicidas y disminución en el contenido de lignina

<sup>f</sup>Con expresión de pro-quimosina bovina en semilla

## **Manejo responsable de los OGM**

### **Mitigar el flujo de genes:**

Guardar distancias de seguridad con cultivos emparentados no transgénicos y evitar que coincidan las fechas de floración.

Monitoreo de:

Especies silvestres sexualmente compatibles con el OGM y la probabilidad de que el transgén difunda en ellas.

Cambios en las características de poblaciones de patógenos, insectos y malezas relacionadas con el OGM y medidas para evitar o retardar la aparición de biotipos resistentes.

Cambios en la dinámica de poblaciones de otras especies vegetales y animales que comparten el hábitat (polinizadores, parásitos y predadores, microflora y fauna del suelo).

### **Tomar medidas para contrarrestar la selección natural de resistencias:**

Utilización de refugios para contener el escape de alelos de resistencia (p. ej. en insectos): al menos 10% de superficie cultivada con no-transgénicos en bandas cada 1500 m.

Rotación de cultivos

Uso de cultivos de cobertura