



**Nombre del alumno: Hernández Morales  
Jazmín**

**Nombre del profesor: Nájera Mijangos  
Hugo**

**Nombre del trabajo: Técnicas moleculares**

**Materia: Genética humana**

**PASIÓN POR EDUCAR**

**Grado: 3ero Grupo B**

**Facultad de medicina**

Comitán de Domínguez Chiapas a 29 de octubre del 2021

## INTRODUCCION

El descubrimiento de la estructura doble del DNA, la purificación del DNA y el conocimiento de la actividad que presenta ciertas enzimas (endonucleasas de restricción) sobre los ácidos nucleicos, puso en el escenario científico las herramientas necesarias para comprender ciertos procesos fisiológicos. Son muchas las disciplinas que han utilizado las tecnologías moleculares como puente para ampliar el conocimiento y sin duda, en las ciencias relacionadas con el estudio del ojo esta nueva herramienta ha generado un fuerte impacto. La correlación entre genotipo y fenotipo ha permitido precisar la clasificación de enfermedades oculares hereditaria como el albinismo. Igualmente ha generado un nuevo camino para la comprensión de la fisiología de enfermedades con un componente genético en su etiología, como en el caso del glaucoma. A partir de la genética molecular se han desarrollado técnicas, a nivel del DNA, para el diagnóstico prenatal o presintomático de patologías como la Retinitis Pigmentosa y el Retinoblastoma. El uso de la PCR (del inglés Polymerase Chain Reaction), el desarrollo del DNA recombinante y la ingeniería genética ha revolucionado por completo la biología, el estudio molecular ha sido la piedra angular para múltiples adelantos científicos. Mediante esta revisión se pretende realizar una síntesis de las principales metodologías moleculares y determinar en términos globales su contribución en las ciencias relacionadas con el estudio ocular

## **Técnica PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)**

La finalidad de esta técnica es la amplificación en masa de determinado fragmento de DNA por medio de un "termociclador". Consiste de manera global en una serie repetitiva de ciclos, cada uno de los cuales consta de un patrón de denaturación (Temperatura 94°C), un tiempo de alineamiento del "primer" (Temperatura de 45-55°C) y un periodo de extensión (Temperatura de 72° C), que se logra mediante una enzima DNA polimerasa termostable, para crear una acumulación de fragmentos específicos. El producto sintetizado en cada ciclo puede servir como patrón en el próximo número de copias de DNA, creándose una reacción en cadena que permite amplificar un fragmento específico de DNA. Esta técnica ofrece "sensibilidad" debido a que a partir de cantidades muy pequeñas de material genético se detecta la presencia del microorganismo en una muestra; "especificidad" ya que a través de condiciones estrictas se logra amplificar únicamente el microorganismo que se busca detectar; "velocidad" que permite un procesamiento rápido si se compara con otras técnicas para detectar bacterias, hongos y virus, que requieren de cultivos celulares para aislamiento de virus. Finalmente se puede mencionar que ofrece "versatilidad" ya que con el mismo fundamento se permite el diagnóstico de diversos microorganismos.

## **Electroforesis de ácidos nucleicos y proteínas**

La finalidad de esta técnica es separar biomoléculas por peso molecular bajo la acción de un campo eléctrico. De esta forma los fragmentos de DNA que se obtienen a partir de la utilización de enzimas de restricción (que tienen la capacidad de cortar el DNA en sitios específicos) puede separarse uno del otro mediante la electroforesis en geles de agarosa (polisacárido puro que se utiliza para realizar placas de agar). El gel se sumerge en un buffer (solución amortiguadora) y los fragmentos de DNA se cargan en pozos. Estos se mueven a través del gel por acción de una carga eléctrica. Una vez transcurrido el tiempo de corrimiento de los fragmentos, el gel se sumerge en un colorante Bromuro de etidio para ser visualizado en un transiluminador observando los diversos fragmentos.

## **Secuenciación de DNA**

La finalidad de esta técnica radica en investigar la secuencia exacta de nucleótidos de un determinado fragmento de DNA. El principio básico de un método se explica que durante la síntesis de una cadena de DNA, la enzima polimerasa añade los dNTP uno tras otro, en el orden que tiene la cadena molde. Durante este proceso de secuenciación, generalmente se realizan cuatro reacciones correspondientes a cada una de las bases nitrogenadas que hacen parte de la cadena de DNA.

## **Clonación de fragmentos de DNA**

Este método consiste en introducir un fragmento de DNA dentro de un vector, el cual usualmente es un plásmido o un virus ya que poseen una capacidad alta de replicación dentro de las células. Este proceso comprende:

- Rompimiento de las células vivas.
- Remoción del material genético de las células.
- Obtención de genes específicos, separándolos del resto de DNA (para esto se utilizan las enzimas de restricción que reconocen y cortan secuencias específicas en el DNA).
- Incorporación de secuencias específicas de vectores. Estos son secuencias cortas de DNA que pueden penetrar la membrana de una célula viva y multiplicarse dentro de ella. Los vehículos o vectores reciben diferentes denominaciones dependiendo del tamaño que tengan; de esta forma se conocen: los plásmidos son fragmentos de DNA de 5 a 10 Kb (un Kb corresponde a 1000 pares de nucleótidos); los bacteriófagos son virus que infectan bacterias y tienen un tamaño aproximado de 45 KbM; y el Yac que es un cromosoma artificial de levaduras con tamaño de 1000 Kb.
- Transferencia del vector a la célula hospedera adecuada que usualmente es una bacteria o levadura.
- Multiplicación celular para formar los clones que contienen millones de células idénticas. Mediante esta técnica se ha transferido un fragmento de gen que no hace parte natural de la célula quedando esta nueva célula con un fragmento de DNA foráneo.

Otras técnicas utilizadas a nivel del DNA son: análisis indirecto de repeticiones CA por PCR, análisis con fragmentos polimorfos de restricción RLFP (Polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción) y utilización de STR (Regiones en tandem pequeñas). En el análisis indirecto de repeticiones CA por PCR donde son utilizados "primer" fluorescentes que determinan regiones específicas en el gen y permiten por consiguiente evidenciar mutaciones en portadoras y afectados. En los estudios moleculares en los que se utilizan STR se han identificados cambios mutacionales, detección de portadoras, diagnóstico prenatal y consanguinidad genética. Este análisis con STR se establece utilizando una PCR multiplex con "primer" fluorescentes para regiones específicas del DNA, los cuales se usan como marcadores. Estos se amplifican en un control, se adicionan a cada muestra (material de estudio) y son electroforosados en el secuenciador para luego ser analizados de manera

simultánea y determinar si las muestras tienen mutaciones al ser comparadas con los controles. Esta técnica ofrece ventajas debido a que requiere poca cantidad de DNA, un número bajo de ciclos en la PCR con lo cual se simplifica el tiempo en la obtención de resultados, además ofrece una mayor normatividad y precisión y se elimina la necesidad de usar material radiactivo.

### **Terapia génica**

Esta metodología busca el reemplazo o recuperación de genes alterados o la incorporación de segmentos de DNA como mecanismos de terapia; por consiguiente, si se conoce el segmento alterado es posible incorporar en la célula defectuosa una copia normal del gen. Por esto es necesario identificar y sintetizar el fragmento de ADN, introducir por métodos físicos, químicos o biológicos el segmento de ADN en las células y finalmente asegurarse que la incorporación de este material no causa efectos secundarios como rechazo por el organismo o reacciones por parte del sistema inmunológico. La incorporación de estos genes se puede realizar en las células somáticas, de esta forma, se cambia el genoma del individuo pero esta modificación no pasa a los descendientes; por el contrario, si el reemplazo genético se lleva a cabo en los gametos, se cambia y se transmite a la siguiente generación.

### **Bases genéticas de enfermedades oculares comunes**

Las enfermedades asociadas con alteraciones oculares pueden originarse a nivel cromosómico, monogénico y multifactorial. A nivel cromosómico se presentan deficiencias por fallas en el número o estructuras de los cromosomas. Los defectos debido al número de cromosomas se pueden denominar aneuploidias y poliploidias. En el primer caso existe pérdida o ganancia de uno o dos cromosomas, siendo al pérdida una monosomía y la ganancia una trisomía; y en segundo caso existen dos o tres juegos completos de cromosomas así: 92, 138, 184... Los defectos debido a cambios en la estructura pueden darse por duplicaciones, deleciones, constituyen pérdida de un segmento de DNA. Translocación implica que un segmento de cromosoma se adicione a otro, por ejemplo: un fragmento del cromosoma 21 al cromosoma 14; en las inversiones un pedazo de cromosoma se rompe, gira sobre su eje y se reorganiza en el mismo cromosoma y división celular, lo que ocasiona que una célula contenga el brazo largo del cromosoma y no tenga la información correspondiente al brazo corto y viceversa. Los trastornos monogénicos son debidos a genes con mutaciones simples, pueden ser autosómicos dominantes, autosómicos recesivos y ligados al cromosoma X. En las fallas génicas que originan mutaciones autosómicas dominantes, tanto el genotipo homocigoto como el genotipo

heterocigoto se ven afectados mientras que en las mutaciones asociadas a herencia autosómica recesiva solo se va a manifestar en defecto en caso de homocigosis. En la herencia ligada al X, las mujeres por tener dos cromosomas pueden ser homocigotas o heterocigotas (portadoras); en el caso de los hombres que solo presentan un cromosoma X estarían afectados si heredan el cromosoma X que tiene el gen mutante y serán heterocigotos

Los trastornos multifactoriales se deben a alteraciones en varios genes y son producto de múltiples factores genéticos y ambientales; es poco lo que se conoce sobre estos genes en patologías oculares. En la actualidad se sabe que en la patogénesis de glaucoma de ángulo primario abierto interviene un componente genético importante, sin embargo aun se desconoce la cantidad de genes que participan y la forma en que interactúan con factores ambientales. De igual forma, el DNA mitocondrial reviste gran importancia debido a que algunas enfermedades oculares están asociadas a mutaciones en dicha estructura, especialmente neuropatía óptica de Leber y retinitis pigmentosa de herencia materna entre otras.

## Bibliografía

MOLINA, T. P. (2019 ). *TECNICAS MOLECULARES* . Obtenido de <https://www.tesisenred.net/bitstream/handle/10803/670281/esi1de1.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

*TECNICAS MOLECULARES* . (18 de OCTUBRE de 2019). Obtenido de <https://espanol.cdc.gov/flu/professionals/diagnosis/molecular-assays.htm>

Palomino-Camargo, Carolina, & González-Muñoz, Yuniesky. (2014). Técnicas moleculares para la detección e identificación de patógenos en alimentos: ventajas y limitaciones. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 31(3), 535-546. Recuperado en 29 de octubre de 2021, de [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1726-46342014000300020&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46342014000300020&lng=es&tlng=es).