

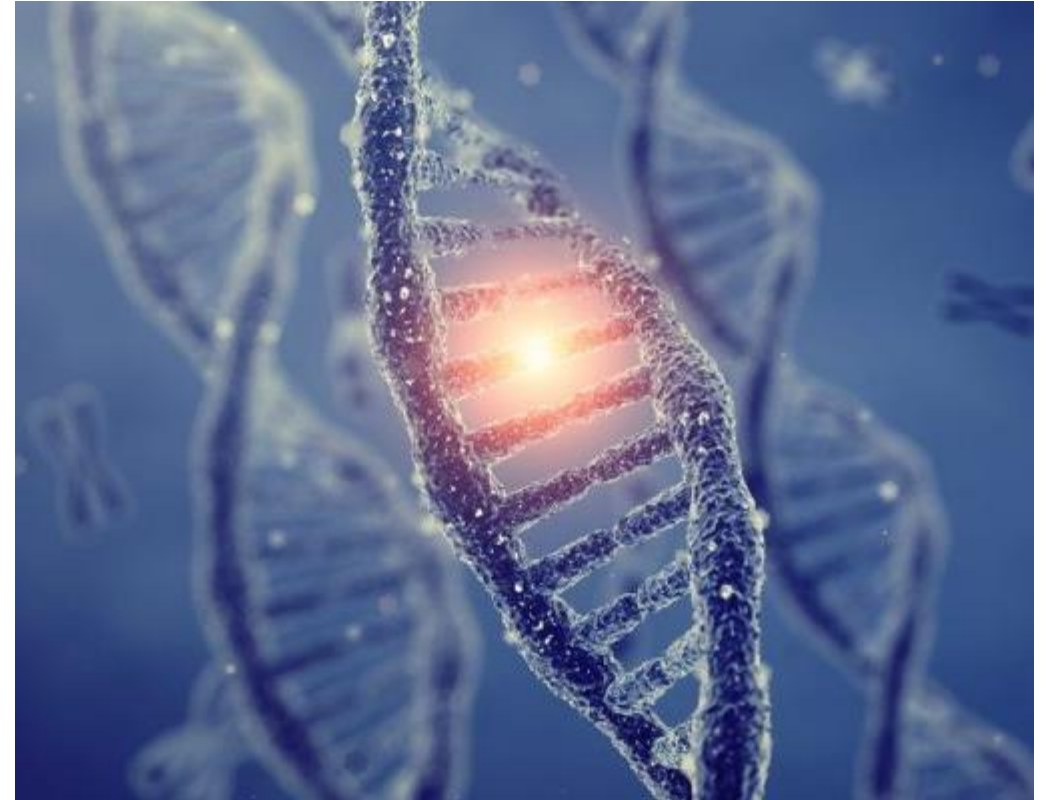
UNIDADE 3: XENÉTICA MOLECULAR

AS MUTACIÓNS
ENXEÑERÍA XENÉTICA

AS MUTACIONES

AS MUTACIÓNS

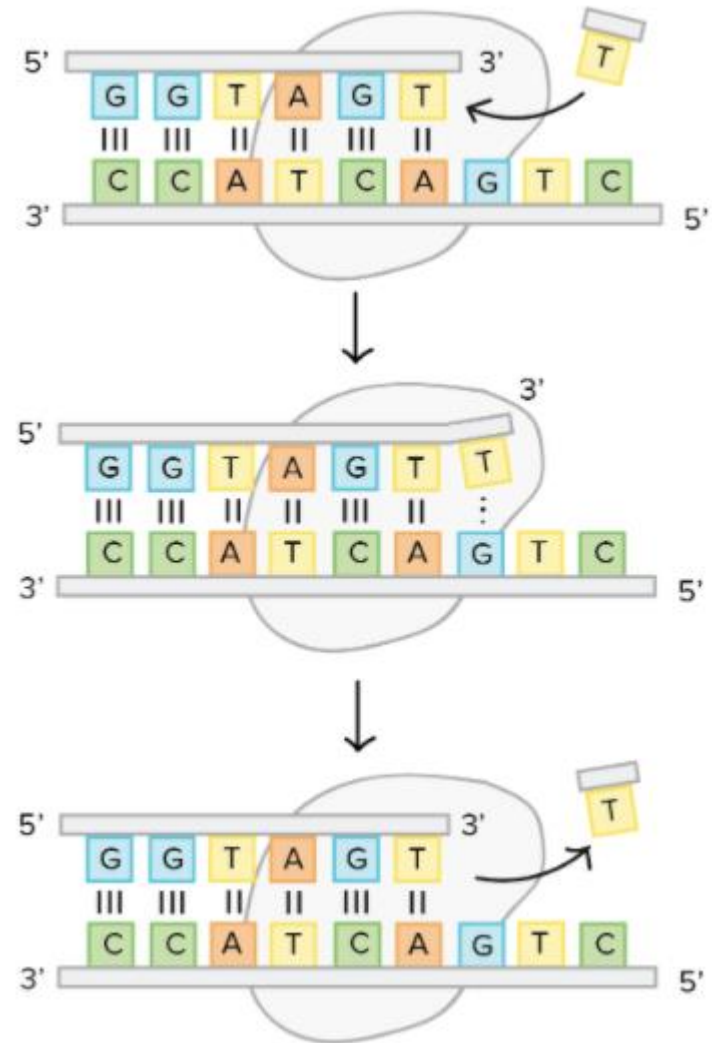
- DEFINICIÓN: alteracións do material xenético que poden ter consecuencias negativas, positivas ou inocuas.
- CAUSAS: débense a erros na replicación do ADN e a reparticións anómalas nas divisións celulares.



MECANISMOS DE REPARACIÓN

- REVISIÓN.

A **ADN polimerase**, cada vez que engade un novo nucleótido, comproba se o anterior está correctamente posto ou non.

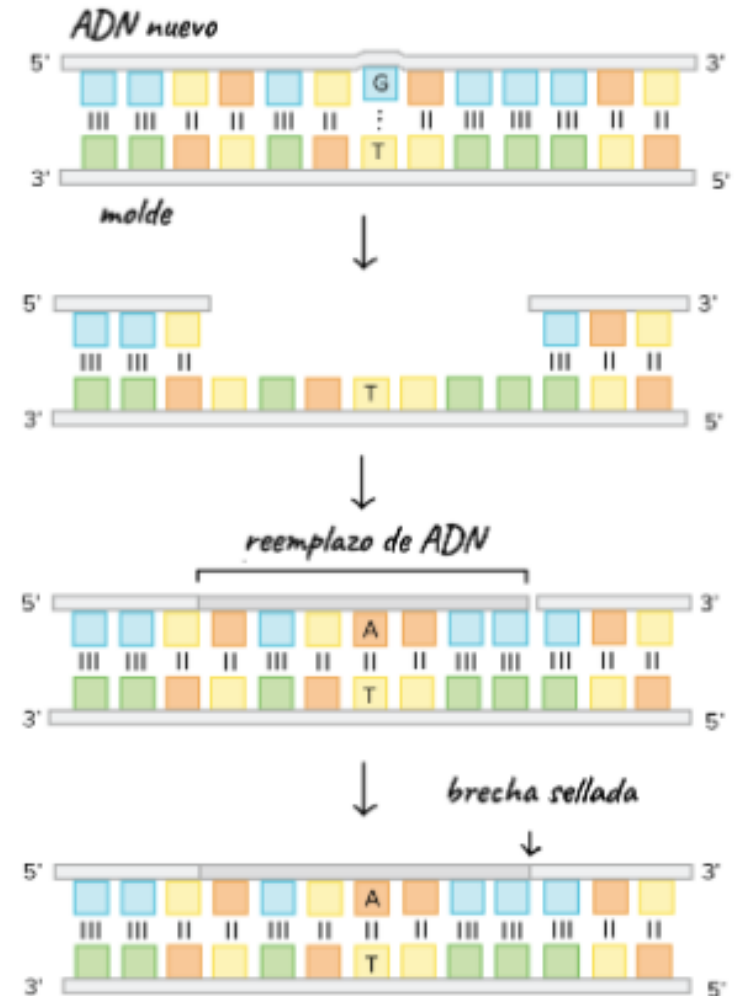


MECANISMOS DE REPARACIÓN

- REPARACIÓN.

Varias encimas, capaces de cortar a cadeia de ADN internamente, leen a cadeia de ADN molde e a cadeia sintetizada a partir dela.

Se detectan algún erro producen dous cortes a cada lado do mesmo. A porción de ADN eliminase e a **ADN polimerase II** sintetiza o segmento correcto que posteriormente será insertado no ADN inicial.



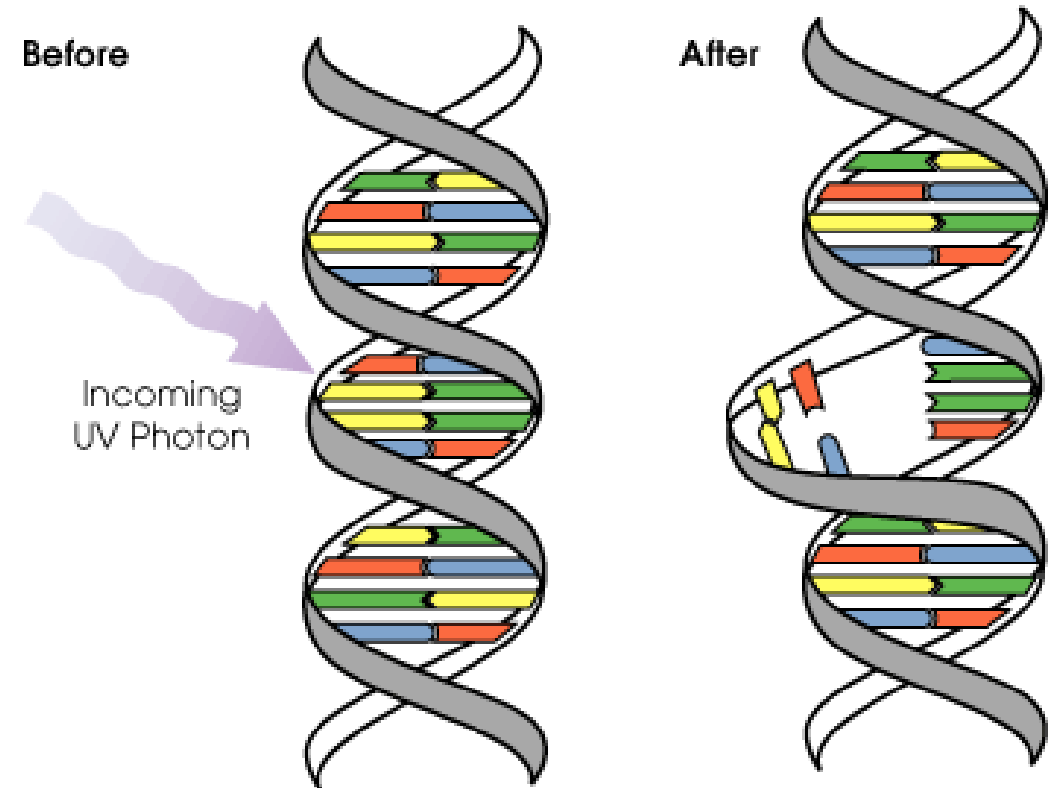
CLASIFICACIÓN DAS MUTACIÓNS

- Segundo a súa **orixe**.
 - **Mutacións espontáneas**: aparecen sen intervención de ningún factor externo.
 - **Mutacións inducidas**: provocadas por algún factor externo, como os axente mutáxenos.

MUTÁXENOS FÍSICOS	MUTÁXENOS QUÍMICOS
Radiación ultravioleta (UVB)	Radicais libres
Raios X	Benzopireno, ácido nitroso, etc.
Radiación nuclear	Axentes alquilantes (gas mostaza)

RADIACIÓN ULTRAVIOLETA (UVB)

Os raios UVB absorbidos polo ADN fan que se forme un enlace entre dúas bases pirimidínicas sucesivas da mesma cadea, dando lugar a dímeros de T e dímeros de citosina.



CLASIFICACIÓN DAS MUTACIÓNS

- Segundo a súa **orixe**.
 - **Mutacións espontáneas:** aparecen sen intervención de ningún factor externo.
 - **Mutacións inducidas:** provocadas por algún factor externo, como os axente mutáxenos.

MUTÁXENOS FÍSICOS	MUTÁXENOS QUÍMICOS
Radiación ultravioleta (UVB)	Radicais libres
Raios X	Benzopireno, ácido nitroso, etc.
Radiación nuclear	Axentes alquilantes (gas mostaza)

RAIOS X E RADIACIÓN NUCLEAR.

As radiacións electromagnéticas de onda moi curta son altamente enerxéticas.

Poden romper as cadeas de ADN ou modificar quimicamente algúns dos seus compoñentes.

CHERNOBYL

- 46 mutacións nun mesmo xene en 9 ratos de campo.
- A probabilidade de padecer cancro de tiroides multiplicouse por 30 entre os nenos que vivían preto.
- 400 malformacións no gando en 1990.



CLASIFICACIÓN DAS MUTACIÓNS

- Segundo a súa **orixe**.
 - **Mutacións espontáneas**: aparecen sen intervención de ningún factor externo.
 - **Mutacións inducidas**: provocadas por algún factor externo, como os axente mutáxenos.

MUTÁXENOS FÍSICOS	MUTÁXENOS QUÍMICOS
Radiación ultravioleta (UVB)	Radicais libres
Raios X	Benzopireno, ácido nitroso, etc.
Radiación nuclear	Axentes alquilantes (gas mostaza)

RADICAIS LIBRES

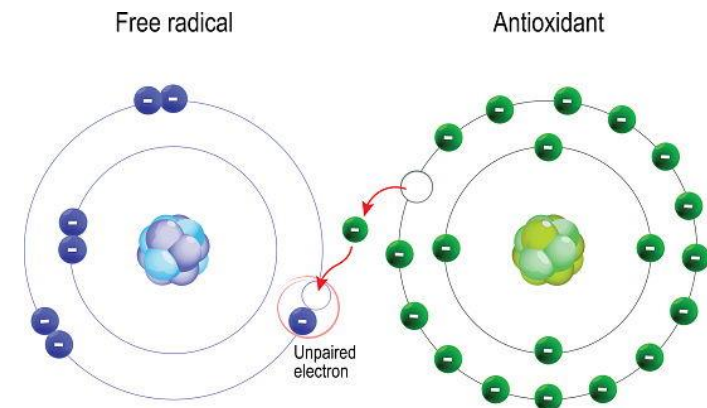
Moléculas cun electrón desapareado, polo que son moi reactivas e poden producir cambios na composición química e na estrutura dos elementos celulares, entre eles, o ADN.

Orixe:

- Metabolismo aerobio do organismo.
- Fume do tabaco.
- NOx procedentes da contaminación atmosférica.
- Combustión de hidrocarburos.

Poden producir:

- Arteriosclerose.
- Artrites reumatoide.
- Enfisema.
- Cáncer
- Envellecemento prematuro.



CLASIFICACIÓN DAS MUTACIÓNS

- Segundo a súa **orixe**.
 - **Mutacións espontáneas**: aparecen sen intervención de ningún factor externo.
 - **Mutacións inducidas**: provocadas por algún factor externo, como os axente mutáxenos.

MUTÁXENOS FÍSICOS	MUTÁXENOS QUÍMICOS
Radiación ultravioleta (UVB)	Radicais libres
Raios X	Benzopireno, ácido nitroso, etc.
Radiación nuclear	Axentes alquilantes (gas mostaza)

BENZOPIRENO

Composto químico que se xera pola combustión incompleta da materia orgánica (petróleo, madeira, tabaco, certos alimentos, etc.). Empeza a formarse a partir dos 300-400°C. Pode provocar carcinoxénese.



CLASIFICACIÓN DAS MUTACIÓNS

- Segundo a súa **orixe**.
 - **Mutacións espontáneas**: aparecen sen intervención de ningún factor externo.
 - **Mutacións inducidas**: provocadas por algún factor externo, como os axente mutáxenos.

MUTÁXENOS FÍSICOS	MUTÁXENOS QUÍMICOS
Radiación ultravioleta (UVB)	Radicais libres
Raios X	Benzopireno, ácido nitroso, etc.
Radiación nuclear	Gas mostaza

GAS MOSTAZA

Arma química utilizada na I Guerra Mundial por ambos bandos e durante a guerra de Irán-Iraq na década dos 80.

Inhibe a replicación do ADN e bloquea a glutatión, unha molécula antioxidante que loita contra os radicais libres.

Son carcinógenos a medio-longo prazo e teratógenos.



CLASIFICACIÓN DAS MUTACIÓNS

- Segundo a **natureza da alteración** que provocan.

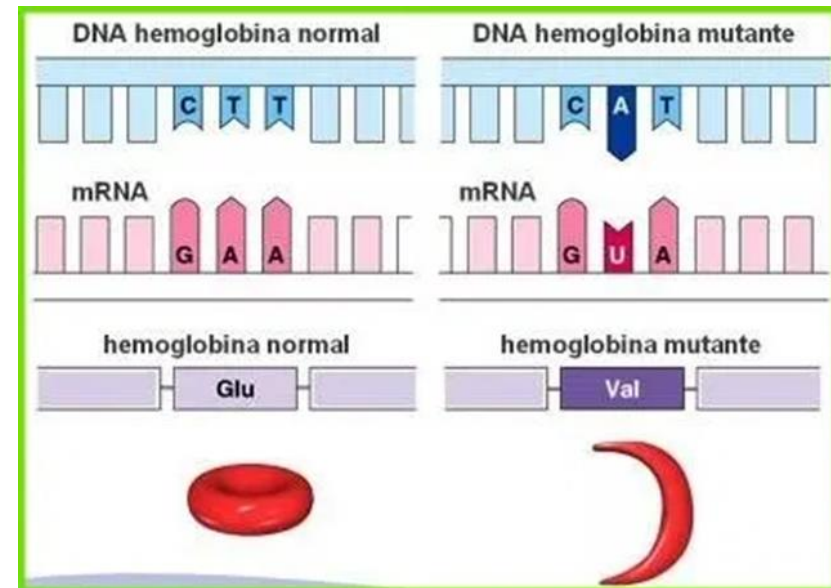
- **Xénicas.**
- **Estruturais ou cromosómicas.**
- **Numéricas.**

- **XÉNICAS.**

Alteracións pequenas e puntuais dos nucleótidos do ADN dun xene, normalmente por substitución dunhas bases por outras.

Poden provocar cambios no ARNm e na proteína para a que codifica.

Ex. Anemia falciforme.



CLASIFICACIÓN DAS MUTACIÓNS

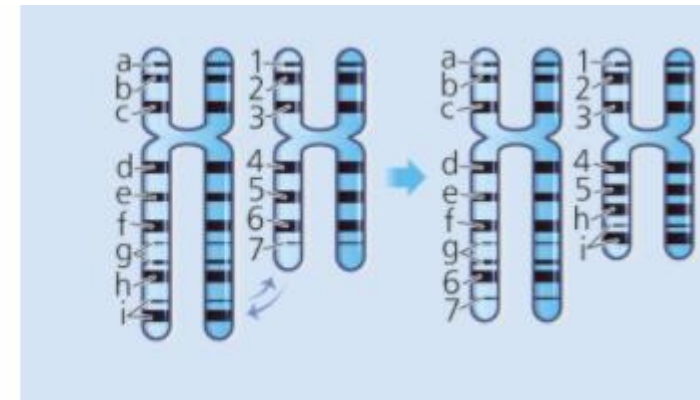
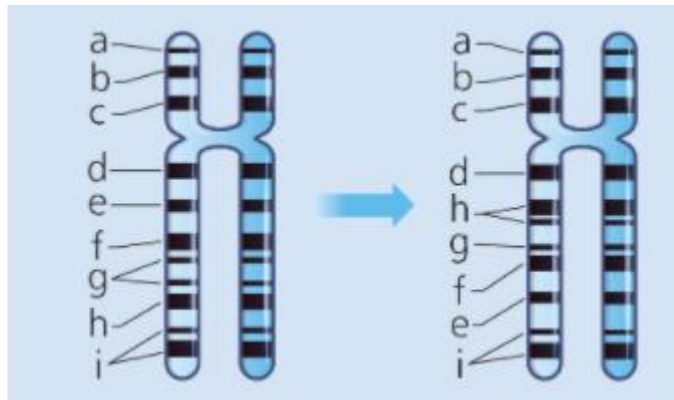
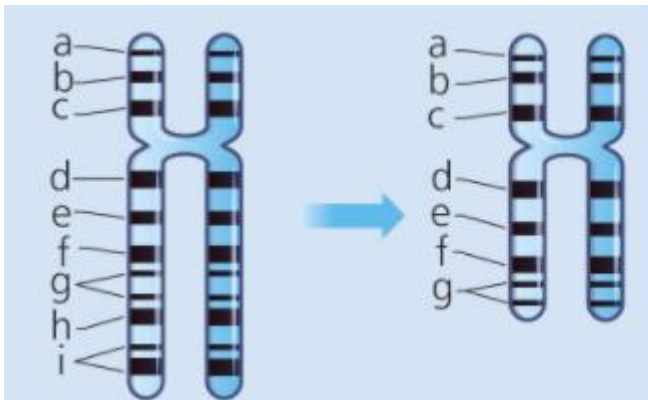
- Segundo a **natureza da alteración** que provocan.

- **Xénicas.**
- **Estruturais ou cromosómicas.**
- **Numéricas.**

- **ESTRUTURAIS OU CROMOSÓMICAS.**

Alteracións que afectan a fragmentos cromosómicos ou a cromosomas enteiros. Débense á aparición de dúas roturas cromosómicas, podendo dar lugar a:

- **Delección:** perda dun fragmento cromosómico.
- **Inversión:** cambio de sentido de fragmentos cromosómicos.
- **Translocación:** escisión dun segmento dun cromosoma, que se intercambia co fragmento dun cromosoma non homólogo.



CLASIFICACIÓN DAS MUTACIÓNS

- Segundo a **natureza da alteración** que provocan.

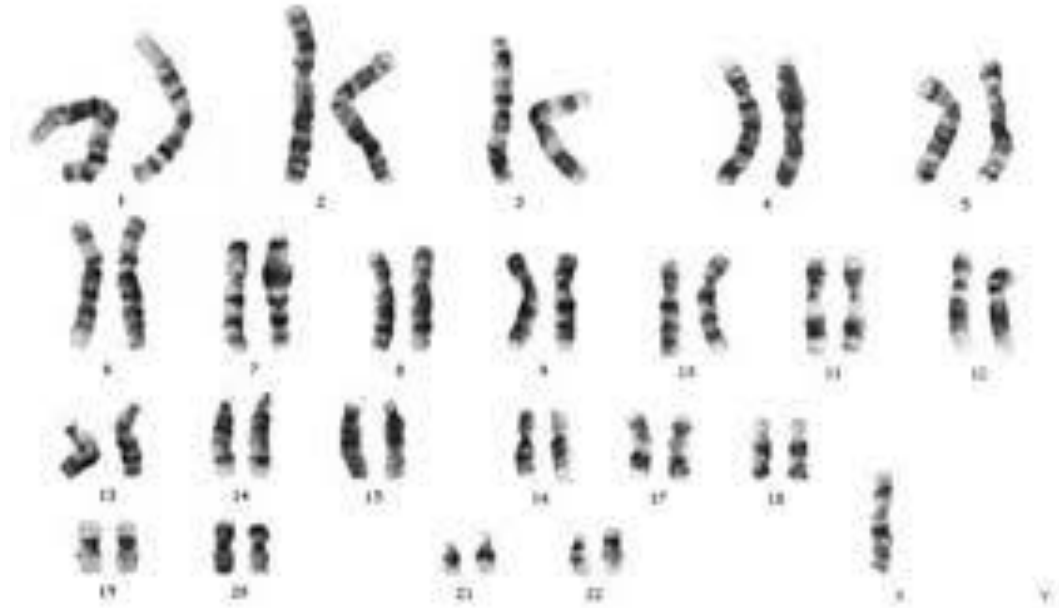
- **Xénicas.**
- **Estruturais ou cromosómicas.**
- **Numéricas.**

- **NUMÉRICAS.**

Afectan ao número normal de cromosomas dunha especie, sen influír na súa estrutura.

Poden ser:

- **Haploidía:** o número de cromosomas dun organismo coincide co número de gametos da súa especie.
 - Machos de formigas e abellas.
- **Poliploidía:** un organismo presenta máis de dous xogos cromosómicos completos. É moi común en plantas.
 - Tres xogos → triploide.
 - Catro xogos → tetraploide.
- **Monosomía:** falta dun cromosoma nunha parella de cromosomas homólogos.
 - Monosomía X (Síndrome de Turner): estériles, xenitalia infantil, baixa estatura e certo aspecto masculino.
- **Trisomía:** existencia dun cromosoma adicional nunha parella de cromosomas homólogos.
 - Trisomía 13 (síndrome de Patau): lesións cardíacas, labio leporino, retraso mental...



CLASIFICACIÓN DAS MUTACIÓNS

- Segundo a **viabilidade** do mutante.
 - **Neutras**: non afectan ao organismo.
 - **Beneficiosas**: proporcionan unha vantaxe ao individuo.
 - **Patolóxicas**: causan enfermidades.
 - **Teratolóxicas**: causan malformacións.
 - **Letais**: producen a morte do portador.

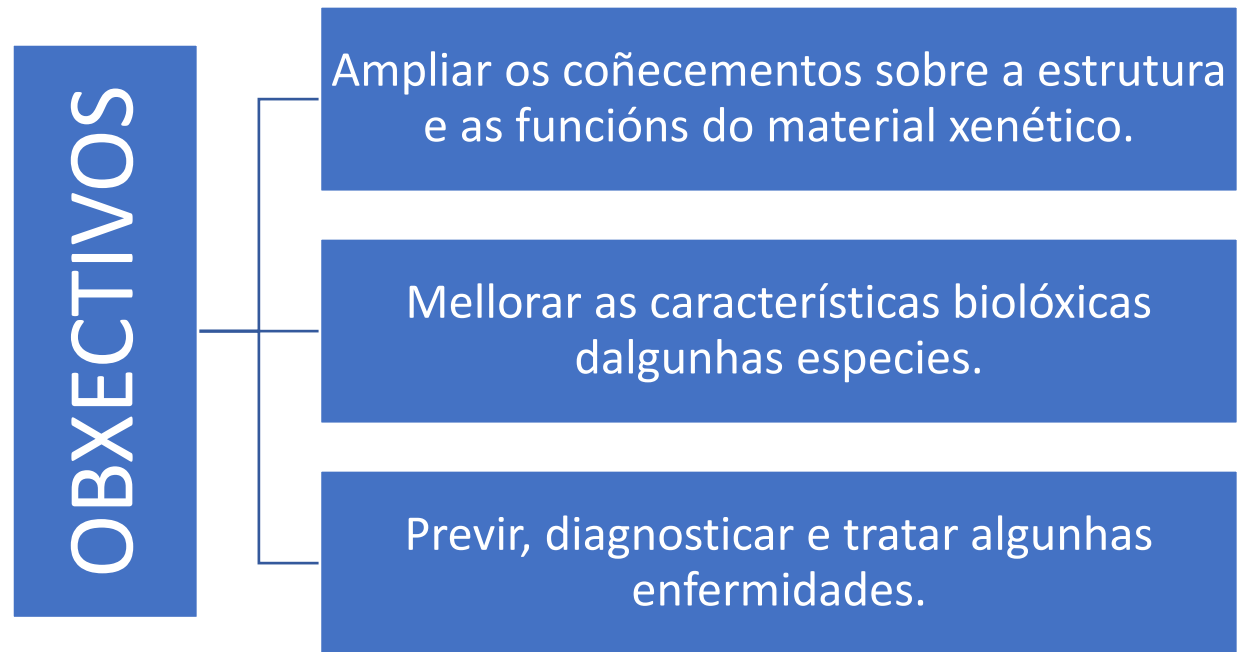
ENFERMIDADES XENÉTICAS

- Existen mutacións que poden dar lugar a distintas **enfermidades**.
 - Mutacións nun **único xene** → Anemia falciforme.
 - Combinación de modificacións en **varios xenes** → Cancro.
 - Desequilibrios a nivel **cromosómico** → Síndrome de Down.
- Dependendo de en que **tipos de células** teña lugar a mutacións, as enfermidades xenéticas poden ser:
 - **HEREDITARIAS**: as mutacións ocorren nas **células reprodutoras** (gametos), polo que afectan á descendencia.
 - **NON HEREDITARIAS**: as mutacións ocorren nas **células somáticas** provocadas por axentes mutáxenos.

ENXEÑERÍA XENÉTICA

ENXEÑERÍA XENÉTICA

- DEFINICIÓN: Conxunto de **técnicas** que permiten a **manipulación dos xenes**, así como a súa **transferencia** duns organismos a outros.

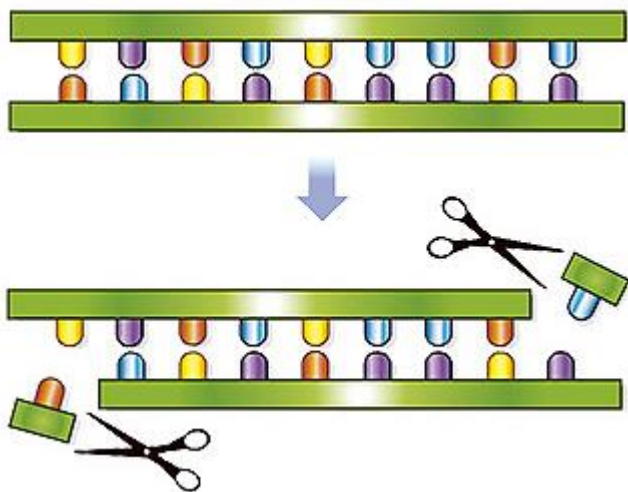


FERRAMENTAS DA ENXEÑERÍA XENÉTICA

Principal utensilio na enxeñería xenética → **ENCIMAS.**

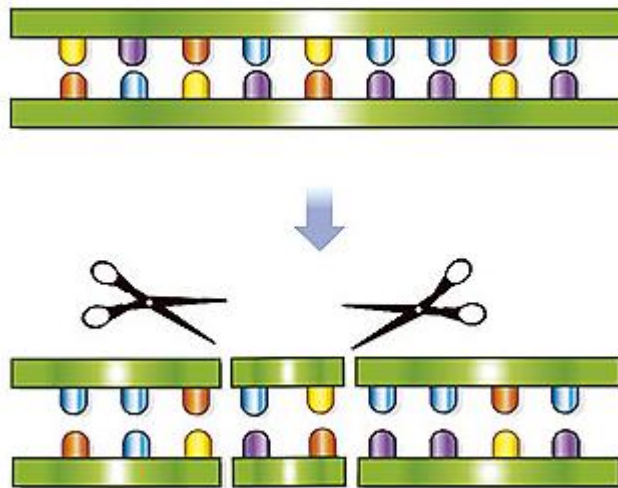
EXONUCLEASES

- Cortan os nucleótidos dos extremos dos ácidos nucleicos.
- Obtéñense nucleótidos illados.



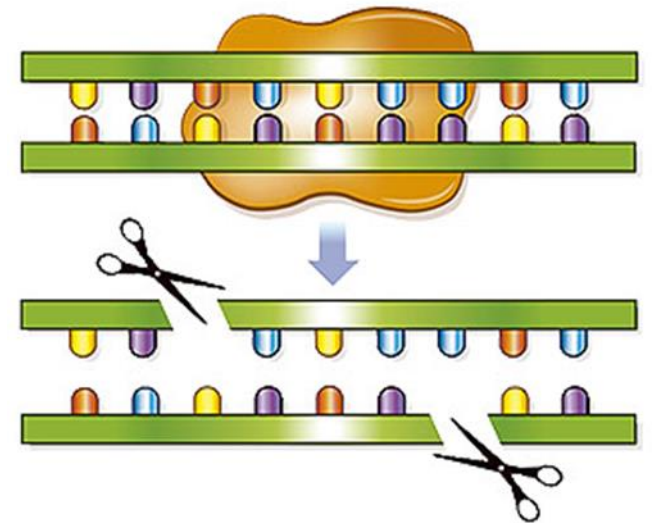
ENDONUCLEASES

- Cortan o ácido nucleico por puntos intermedios.
- Prodúcese fragmentos de ácido nucleico.



NUCLEASES DE RESTRICIÓN

- Cortan o ácido nucleico nun punto cunha secuencia de bases concreta (dianas).

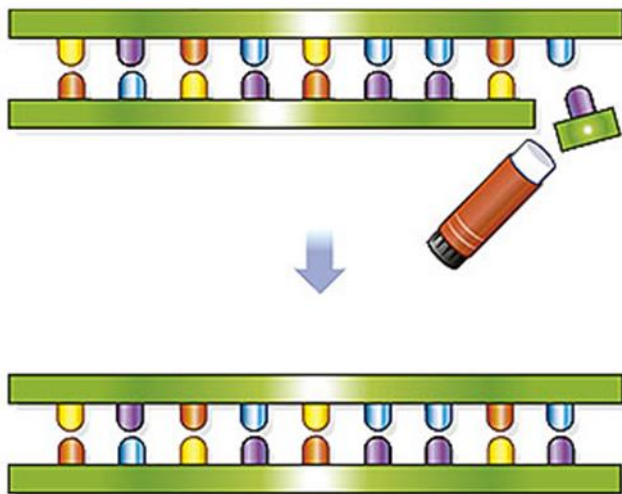


FERRAMENTAS DA ENXEÑERÍA XENÉTICA

Principal utensilio na enxeñería xenética → **ENCIMAS.**

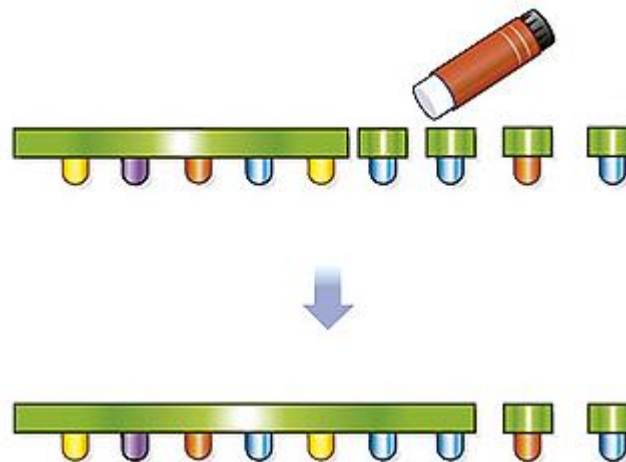
POLIMERASES

- Engaden nucleótidos a unha cadea.
- Precisan unha cadea molde.
- Poden ser de ADN ou ARN.



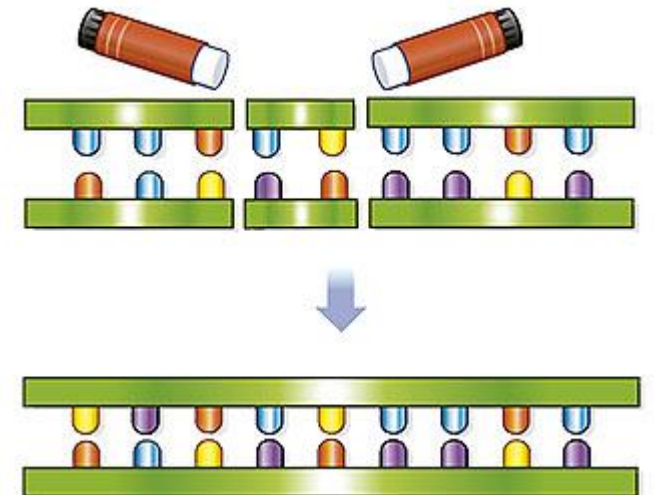
TRANSFERASES

- Engaden nucleótidos a un extremo do ácido nucleico.
- Non precisan dunha cadea molde.



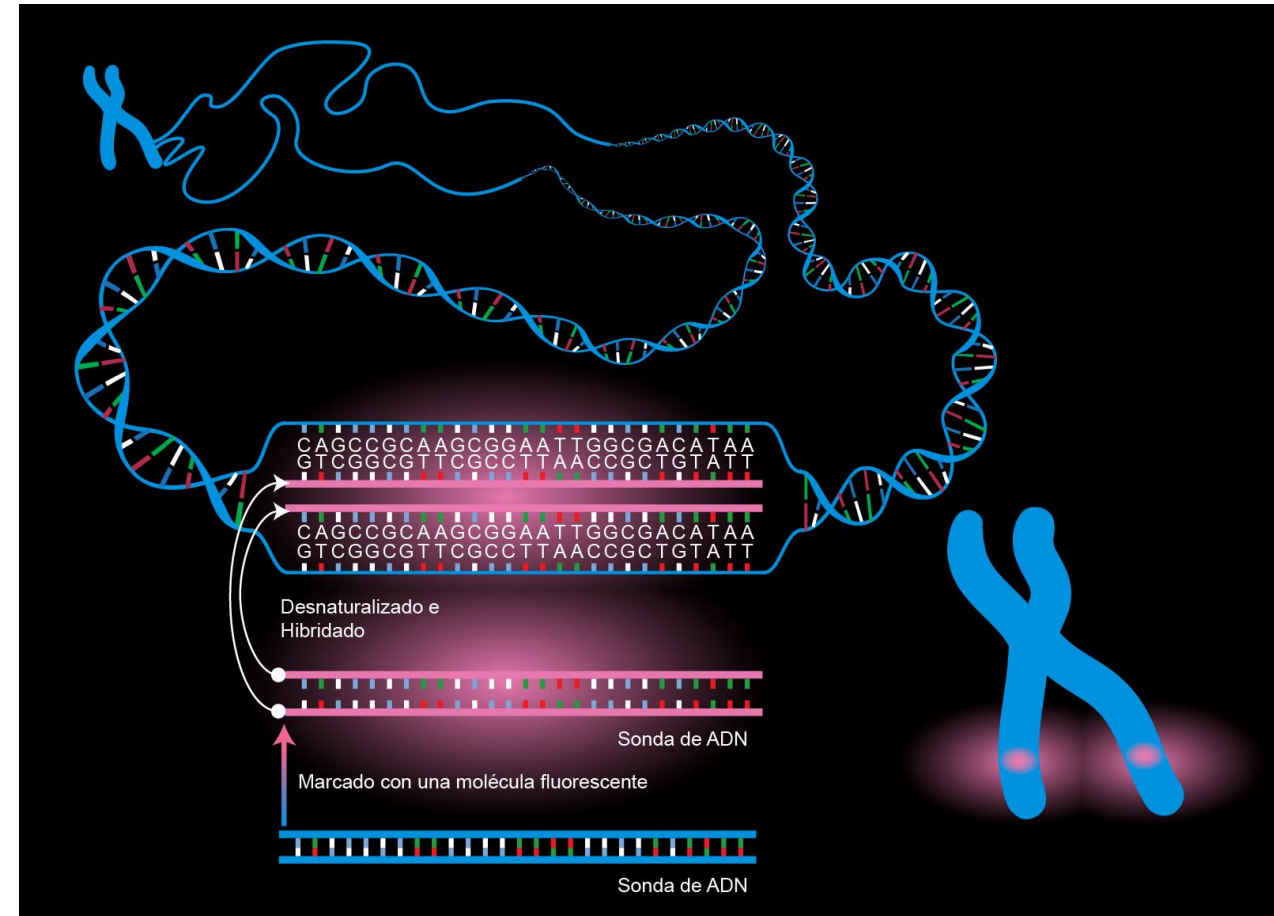
LIGASES

- Unen dúas cadeas de ácido nucleico.



TÉCNICAS DE ENXEÑERÍA XENÉTICA

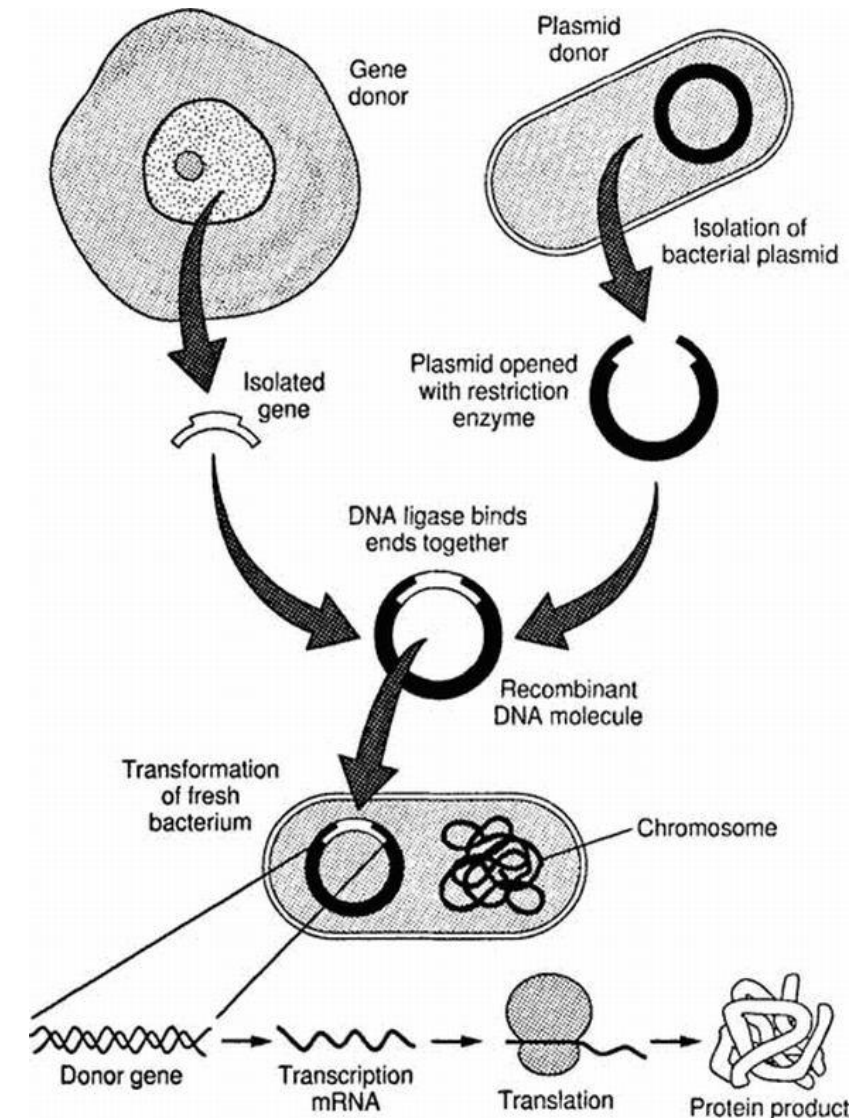
- **HIBRIDACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS.**
- Proceso polo que dúas cadeas complementarias de ácidos nucleicos se unen: ADN-ADN ou ADN-ARN.
- FUNCIÓN: permite detectar secuencias de nucleótidos concretas.
- COMO FUNCIONA?: utilízase un fragmento de ARNm ou ADN de cadea sinxela (sonda) para localizar unha secuencia en concreto. Esta sonda estaría marcada con fluorescentes, polo que ao hibridar ca secuencia que queremos atopar, sería observable.
- APLICACIÓNS:
 - Detectar anomalías xenéticas.
 - Presencia de trisomías ou monosomías.
 - Presenza de mutacións cromosómicas.



TÉCNICAS DE ENXEÑERÍA XENÉTICA

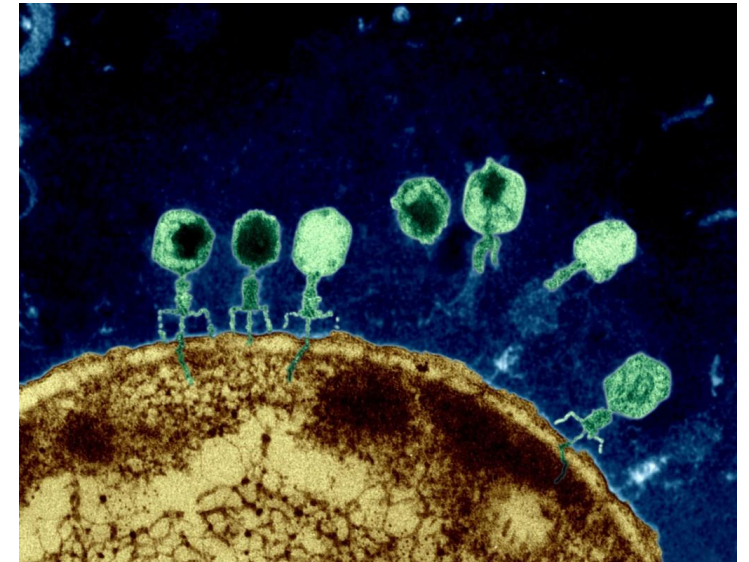
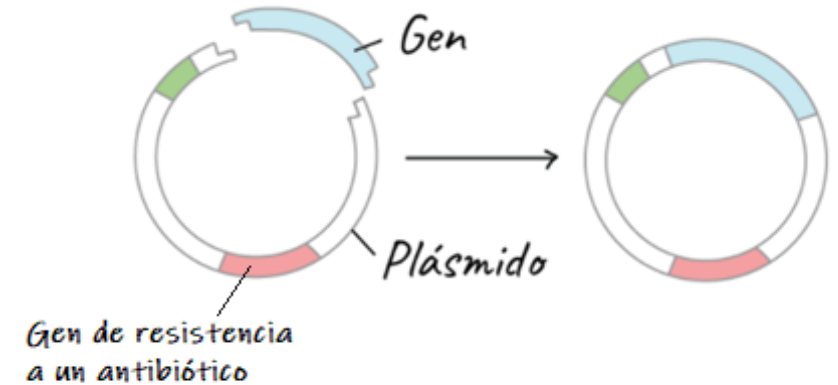
- **ORGANISMOS TRANSXÉNICOS.**
- **ORGANISMO TRANSXÉNICO:** aquel no que se introduce un xene foráneo ou modificado, e que ten capacidade para transmitilo á súa descendencia.
- **COMO FUNCIONA?:**
 1. Recoñezo a secuencia de interese.
 2. Córtoa con encimas de restrición.
 3. Engádoa a un vector → transporte.
 - Plásmido: úsase con bacterias.
 - Virus = ADN con cuberta.
 4. Introduzo o vector en células embrionarias do organismo que queremos modificar.
- **APLICACIÓNS:**
 - Fresas con xenes de peixes do ártico.
 - Plantas de millo resistentes as pragas de insectos.
 - Bacterias que son fábricas de insulina humana.
 - Plantas que producen fármacos.
- **CONTROVERSIA OMG:**

<https://youtu.be/7TmcXYp8xu4>



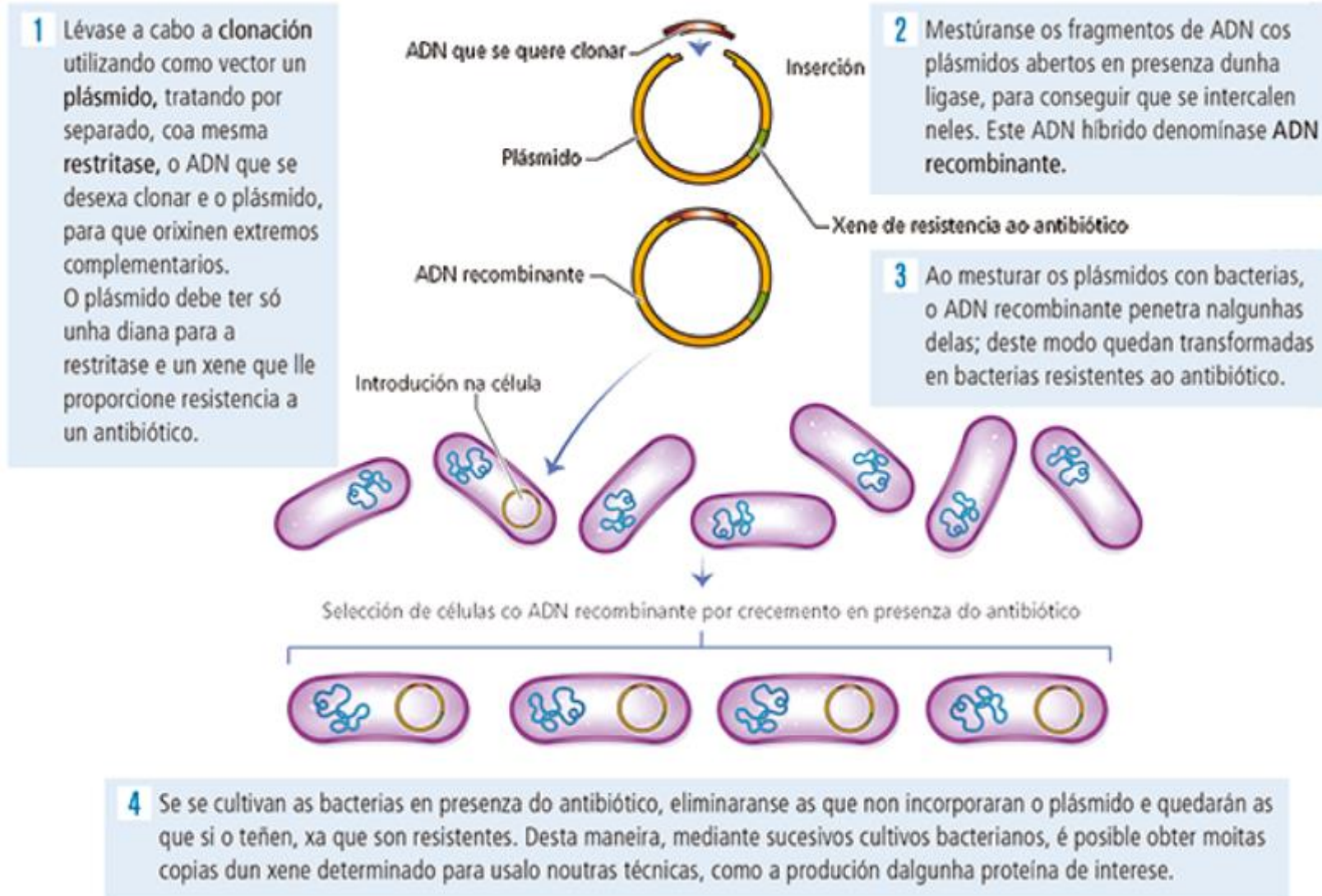
TÉCNICAS DE ENXEÑERÍA XENÉTICA

- **CLONACIÓN DE ADN.**
- Introducción dun fragmento de ADN de calquera especie, para lograr moitas copias del ou para expresalo nunha célula mediante un vector de clonación.
- Vector de clonación: molécula de ADN con capacidade de replicación e expresión dos seus xenes dentro dunha célula.
 - Plásmidos: pequenas moléculas de ADN circular de orixe bacteriana.
 - Bacteriófagos: virus que infectan a bacterias de forma natural.
- Como funciona?:



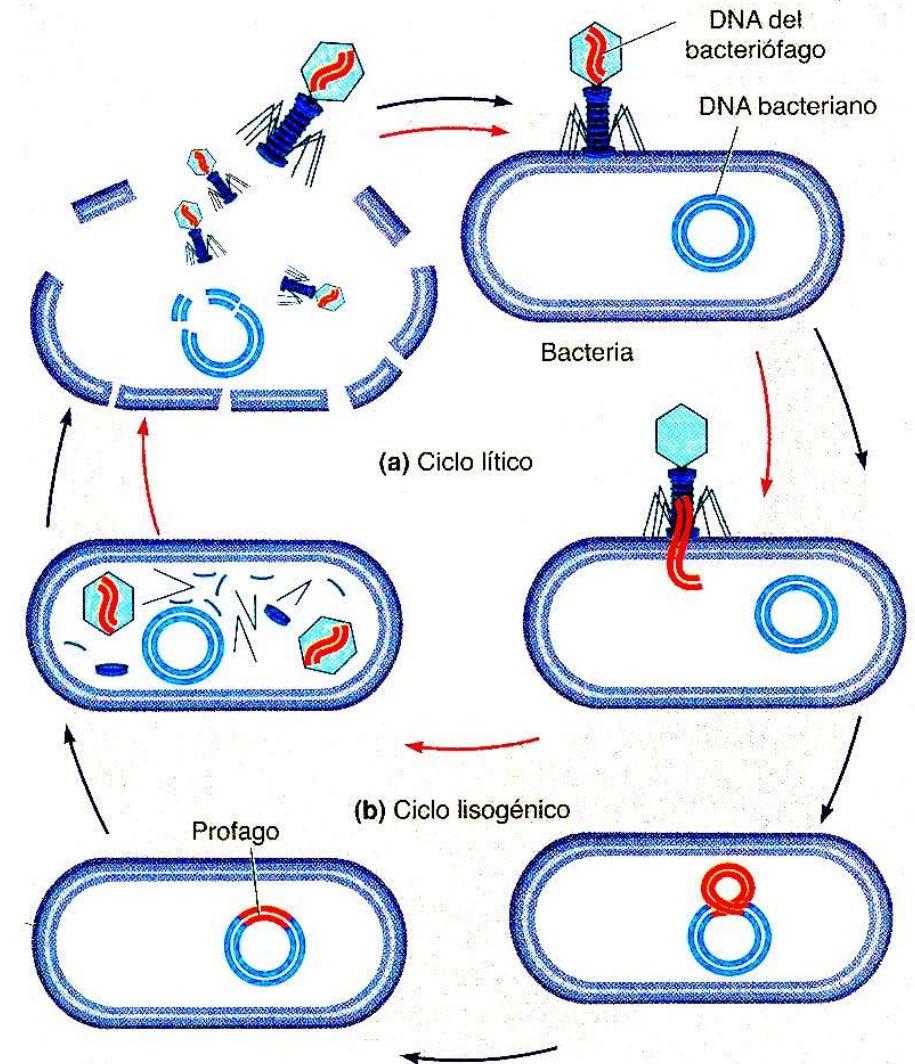
TÉCNICAS DE ENXEÑERÍA XENÉTICA

CLONACIÓN DE ADN USANDO PLÁSMIDOS.



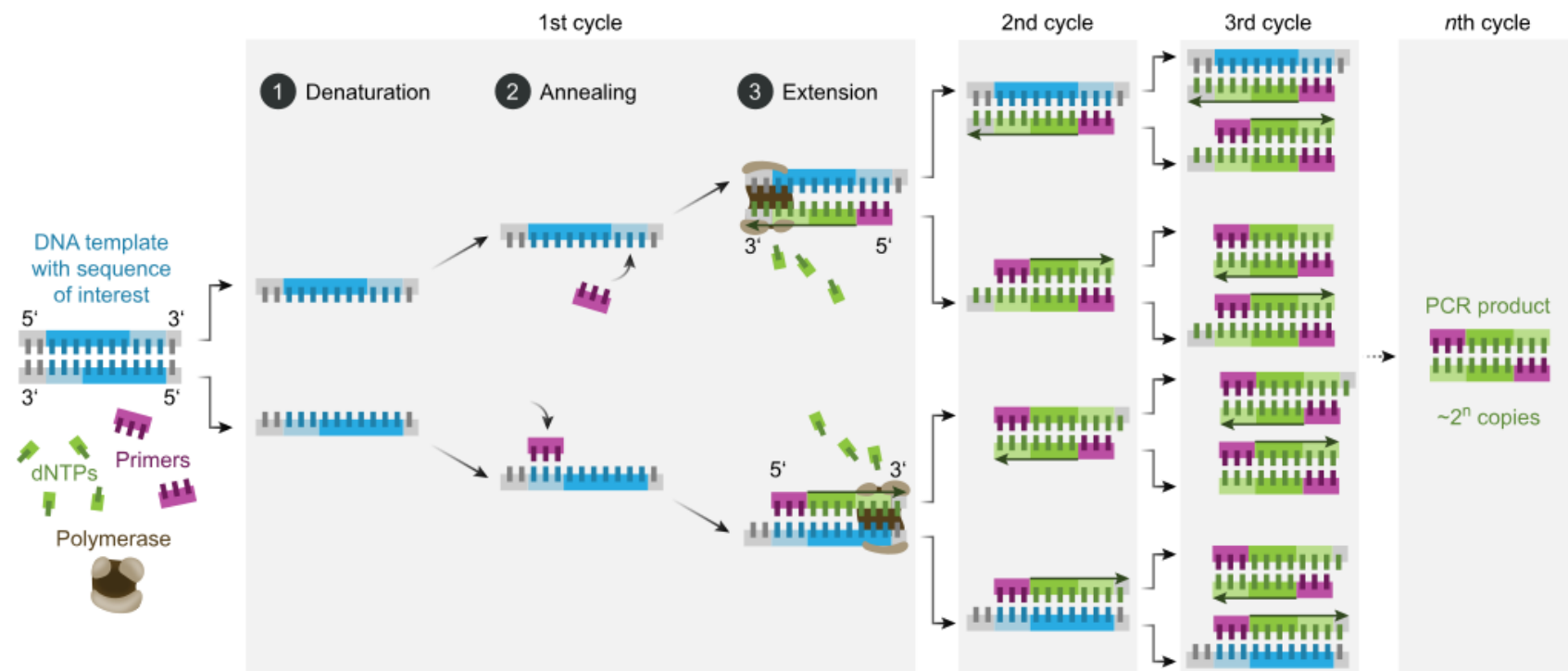
TÉCNICAS DE ENXEÑERÍA XENÉTICA

- A clonación mediante bacteriófagos utiliza o propio ciclo de vida destes virus.
- Durante o ciclo lisoxénico o bacteriófago introduce o seu ADN na bacteria, pasando a formar parte do ADN desta.
- Cando os xenos do virus se repliquen, transcriban e traduzan, darán lugar ás diferentes partes do bacteriófago.
- Aproveitase este ciclo lisoxénico para introducir o ADN que queremos clonar na célula, mediante o propio bacteriófago.
- A bacteria reproducirase, replicando en cada división o seu ADN.



TÉCNICAS DE ENXEÑERÍA XENÉTICA

- **PCR (Reacción en Cadea da Polimerase):** permite fabricar *in vitro* moitas copias de moléculas de ADN de dobre cadea sen necesidade de clonal nunha bacteria.
- Son necesarios os seguintes elementos: o ADN que queremos copiar, cebadores, nucleótidos libres e ADN polimerase.
- Función: utilízase para diagnosticar rapidamente enfermidades xenéticas e para detectar baixos niveis de infección vírica.



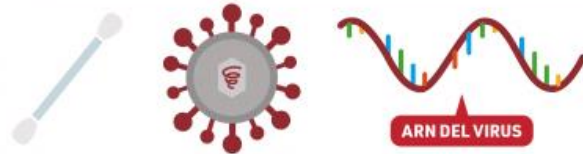
- Como funciona?:
 1. Os extremos do ADN teñen que ter unha secuencia coñecida, polo que se lle pegan fragmentos coñecidos.
 2. Quéntase o ADN para que se desnaturalice (separación das dúas cadeas).
 3. Engádense os cebadores (primers), pequenos fragmentos de ADN de secuencia complementaria á dos extremos do ADN. Ao arrefriar a mostra, producirase un emparellamento.
 4. A polimerase unírase aos cebadores e irá engadindo nucleótidos a medida que le a cadea complementaria.
 5. Este ciclo repítese unha e outra vez ata conseguir a cantidade necesaria de ADN.

¿CÓMO FUNCIONAN LOS TEST DEL CORONAVIRUS?

¿CÓMO FUNCIONAN LOS TEST ACTUALES?

1

Se toma un frotis de la parte interna de la nariz o del fondo de la garganta del paciente. La muestra se lleva a analizar al laboratorio.



2

Se extrae el ARN del virus y se purifica. Una enzima llamada transcriptasa inversa convierte el ARN en ADN.



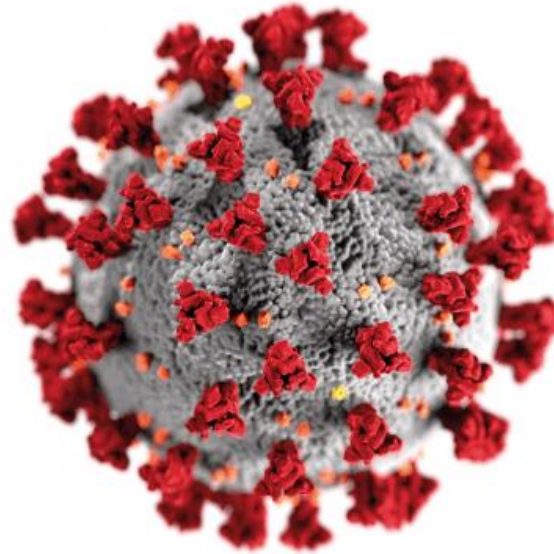
3

El ADN obtenido se mezcla con cebadores, unos fragmentos de ADN diseñados para unirse a zonas características del genoma del virus. Al calentar y enfriar repetidamente una mezcla del ADN del virus, los cebadores y una enzima que sintetiza ADN, se producen millones de copias del ADN viral.



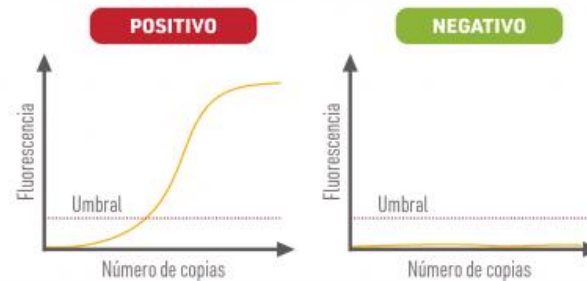
4

Las moléculas de tinte fluorescente se unen al ADN del virus durante la copia. Al unirse producen más luz, que se usa para confirmar la presencia del virus en la muestra.



TEST POSITIVOS Y NEGATIVOS

Cuanto más copias del ADN del virus se producen, mayor es la fluorescencia. Si la fluorescencia supera un cierto umbral, el test da positivo. Si no hay virus, no hay copias del ADN viral y por lo tanto no se pasa el umbral. Entonces, el test da negativo.



PROBLEMAS CON LOS TEST



ESCAZOS DE REACTIVOS

La alta demanda y algunos problemas con los reactivos han retrasado los test en algunos países.



LOS TEST SON LENTOS

Los resultados del test tardan varias horas en llegar, lo que limita el número de test que se realizan.

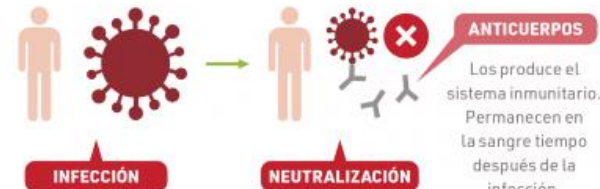


FALSOS POSITIVOS Y NEGATIVOS

En algunos casos, el deterioro o la contaminación de la muestra pueden alterar los resultados.

FUTUROS TEST

Los test actuales funcionan para detectar la infección, pero no nos dicen si alguien ha pasado la enfermedad y se ha recuperado. Detectar anticuerpos contra el virus podría solucionar este problema.

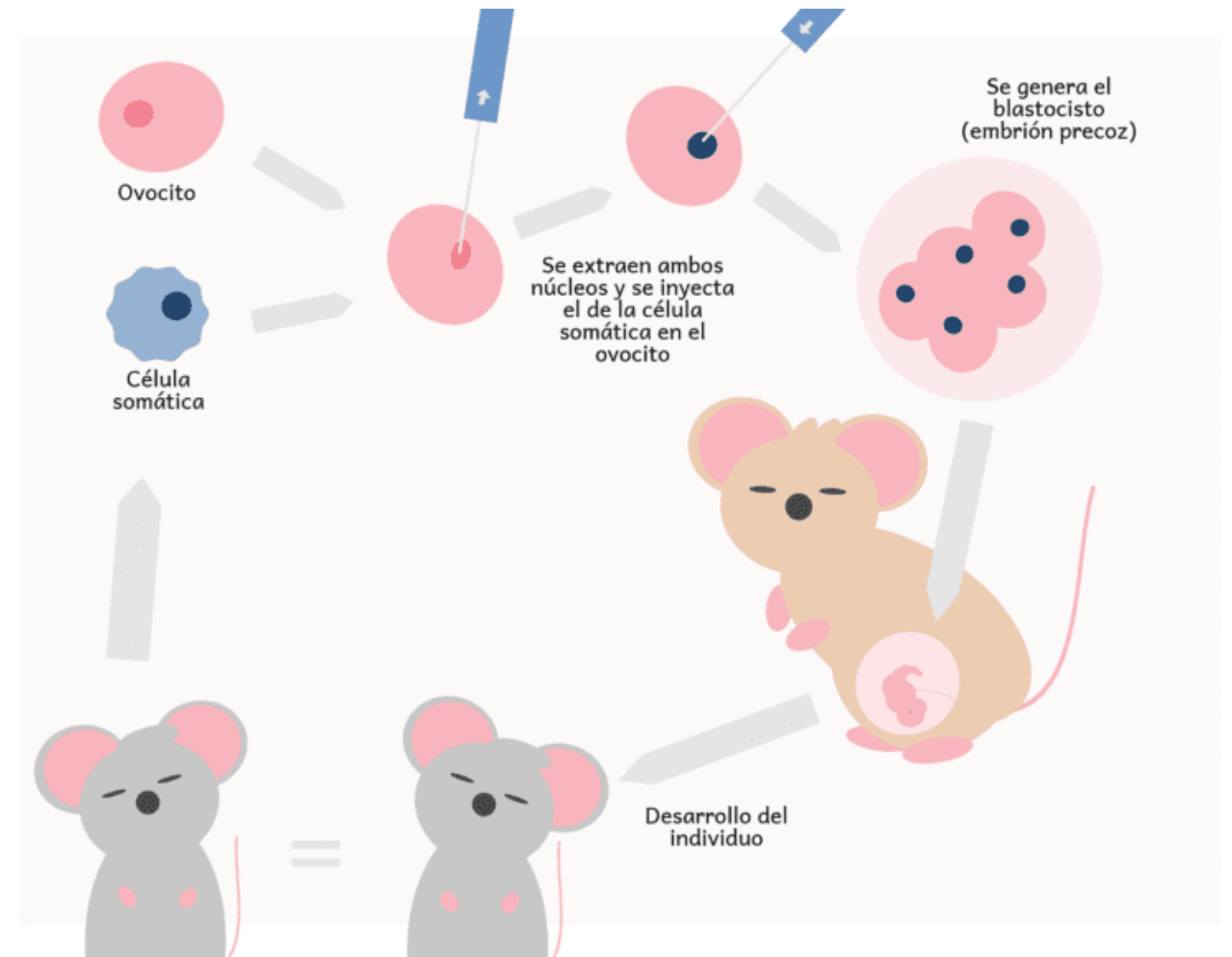


También se están desarrollando test que detectan las proteínas en la superficie de los virus. Son más rápidos, pero menos fiables.



TÉCNICAS DE ENXEÑERÍA XENÉTICA

- **CLONACIÓN REPRODUTIVA.**
- Obtención dun individuo xeneticamente idéntico a outro xa existente.
- COMO FUNCIONA?: o núcleo dun óvulo substitúese polo núcleo dunha célula somática doutro organismo da mesma especie. O óvulo modificado implántase nunha femia da especie.



TÉCNICAS DE ENXEÑERÍA XENÉTICA

- **CLONACIÓN TERAPÉUTICA.**
- Uso de células nai embrionarias iguais ás do receptor para rexenerar tecidos.
- FUNCIÓN: serve como tratamento de enfermidades provocadas polo mal funcionamento de certas células
- COMO FUNCIONA?: para evitar o rexeitamento inmunolóxico, o núcleo da célula nai embrionaria substitúese por un núcleo celular da persoa enferma.

