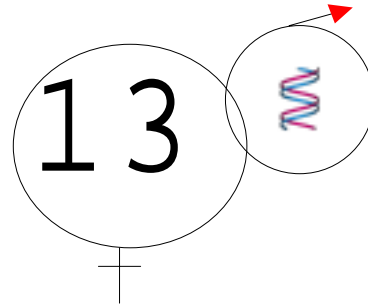


# LIGAMIENTO Y RECOMBINACIÓN

Bárbara Barrios García



*La Ley de Segregación Independiente, estudiada anteriormente, nos explica el comportamiento que siguen dos o más genes diferentes al segregarse en los gametos.*

*Partiendo de esta Ley podemos conocer de antemano las proporciones fenotípicas esperadas en un cruce dado, pero toda Ley tiene su excepción que se expresa en este caso por desviaciones en las proporciones fenotípicas esperadas en diversos cruces.*

*En este Capítulo analizaremos la causa de estas desviaciones, sus características e importancia.*

## LIGAMIENTO. CONCEPTO Y CLASIFICACIÓN

Ya es conocido que nuestra especie tiene una constitución cromosómica de 46 cromosomas, de los cuales 23 provienen de la madre y 23 del padre.

Cuando estudiamos la meiosis explicamos que en la profase de la meiosis I ocurría un mecanismo llamado entrecruzamiento que era el intercambio de material genético entre cromosomas homólogos (cuando estos están en estado de 4 cromátidas), y definimos a este mecanismo como uno de los más importantes en la variabilidad de las especies vivas con reproducción sexual.

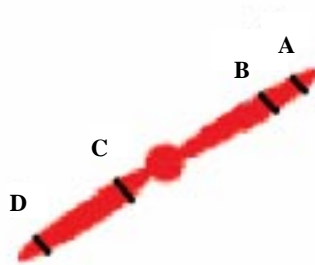
En la actualidad los estudios del genoma humano han descubierto que el hombre tiene alrededor de 45 000 genes que están ubicados en 23 cromosomas, esto nos lleva a pensar que en un cromosoma se sitúan físicamente cientos o miles de genes, lo que implica que entre los genes que se localizan en un mismo cromosoma deben existir diferentes distancias, unos genes estarán muy cercanos entre sí, otros estarán más alejados y otros muy distantes.

(Imagínese la fila de butacas de un cine cuando está lleno, en la misma fila se pueden sentar 20 personas, las personas que se sienten en la 1ra. y 2da. butacas de esa fila van a estar tan juntos, que entre ellos no cabe otra butaca, entre las personas sentadas en la 1ra. butaca y la sentada en la 6ta, caben 4 butacas, están más alejadas pero más juntas

que la persona sentada en la 1ra. butaca y la sentada en la butaca 20ma., que están tan alejadas que no pueden comunicarse entre sí).

Por tanto en un mismo cromosoma se ubican muchos de genes y entre ellos existirán diferentes formas de segregación a los gametos que dependerá de la distancia física entre ellos.

Cuando entre dos genes ubicados en un mismo cromosoma existe una distancia que no permite que ocurra el entrecruzamiento de forma libre o al azar se dice que estos genes están ligados. (Figura 13.1 )



**RELACION DE DIFERENTES GENES UBICADOS EN EL MISMO CROMOSOMA:**

**A - B ESTAN TAN JUNTOS QUE SE ANULA EL ENTRECruzAMIENTO SEGREGANDO JUNTOS AL MISMO GAMETO EXISTE ENTRE ESTOS LIGAMIENTO COMPLETO**

**A - C ESTAN JUNTOS EN EL MISMO CROMOSOMA PERO LA DISTANCIA NO ES TAN PEQUEÑA PARA ANULAR EL ENTRECruzAMIENTO, APARECEN GAMETOS RECOMBINANTES PERO EN NUMERO RESTRINGIDO**

**A - D ESTAN TAN SEPARADOS EN EL MISMO CROMOSOMA QUE CUMPLEN LA LEY DE SEGREGACION INDEPENDIENTE COMO SI ESTUVIERAN UBICADOS EN CROMOSOMAS DIFERENTES**

Figura. 13.1. Se muestra un cromosoma con 4 genes que por sus distancias entre ellos segregan de forma diferente durante la meiosis

Ilustremos las relaciones entre estos genes diferentes ubicados en un mismo cromosoma mediante cruces de híbridos. Los genes representados anteriormente A, B, C y D regulan los siguientes caracteres:

GEN	CARACTERISTICA	GEN	CARACTERISTICA
A	Semillas lisas	a	Semillas rugosas
B	Color púrpura de la flor	b	Color rojo de la flor
C	Hoja redonda	c	Hoja alargada
D	Tallo alto	d	Tallo enano

Si hacemos un cruce prueba o retrocruce (ver Capítulo 5) entre plantas con semillas lisas y tallo alto (AADD) con plantas de semillas rugosas y tallo enano (aadd), los resultados que debemos esperar de acuerdo con las Leyes de Mendel, sería una descendencia con el 25% de cada uno de los cuatro fenotipos posibles, esto es, semillas lisas y tallo alto, semillas rugosas y tallo enano, semillas lisas y tallo enano, y semillas rugosas y tallo alto. Sin embargo, si los genes que determinan estos caracteres se encuentran en el mismo cromosoma debían segregarse juntos hacia el mismo gameto y los descendientes solo mostrarían los fenotipos parentales. Estos resultados se pueden explicar si suponemos que estos dos genes se encuentran muy separados en el cromosoma y por el entrecruzamiento que se produce durante la meiosis I; hayan pasado de un cromosoma a su homólogo en el intercambio entre sus cromátidas.

A los fenotipos que aparecen en los descendientes y que no se corresponden con los paternos se les denomina fenotipos recombinantes, pues son el resultado de la recombinación genética entre las cromátidas de los cromosomas homólogos.

En este cruce la distancia entre los genes A-D es tan grande que el entrecruzamiento ocurre al azar y aparecen 4 tipos de descendientes (Figura 13.2), 2 no recombinantes, pues la combinación de genes en los gametos se produjo sin que ocurriera entrecruzamiento y 2 recombinantes, pues los gametos recibieron una combinación de genes nueva debido al entrecruzamiento entre las cromátidas homólogas (Figura 13.2).

En este cruce se cumple la Ley de Segregación independiente pues aparecen 4 tipos de hijos, 2 no recombinantes (fenotípicamente iguales a los padres) y 2 recombinantes (con combinaciones fenotípicas nuevas diferentes a los padres)

Una situación diferente se presenta cuando los genes están ubicados muy cerca uno de otro en el mismo cromosoma. Como la distancia entre ellos es muy corta la posibilidad de un fenómeno de entrecruzamiento entre ellos es muy baja y esos genes segregarán juntos en los gametos. En este caso, los descendientes exhibirán en proporción igual (50%) los fenotipos parentales (Figura 13.3). En estos casos se dice que entre esos genes existe un ligamiento completo.

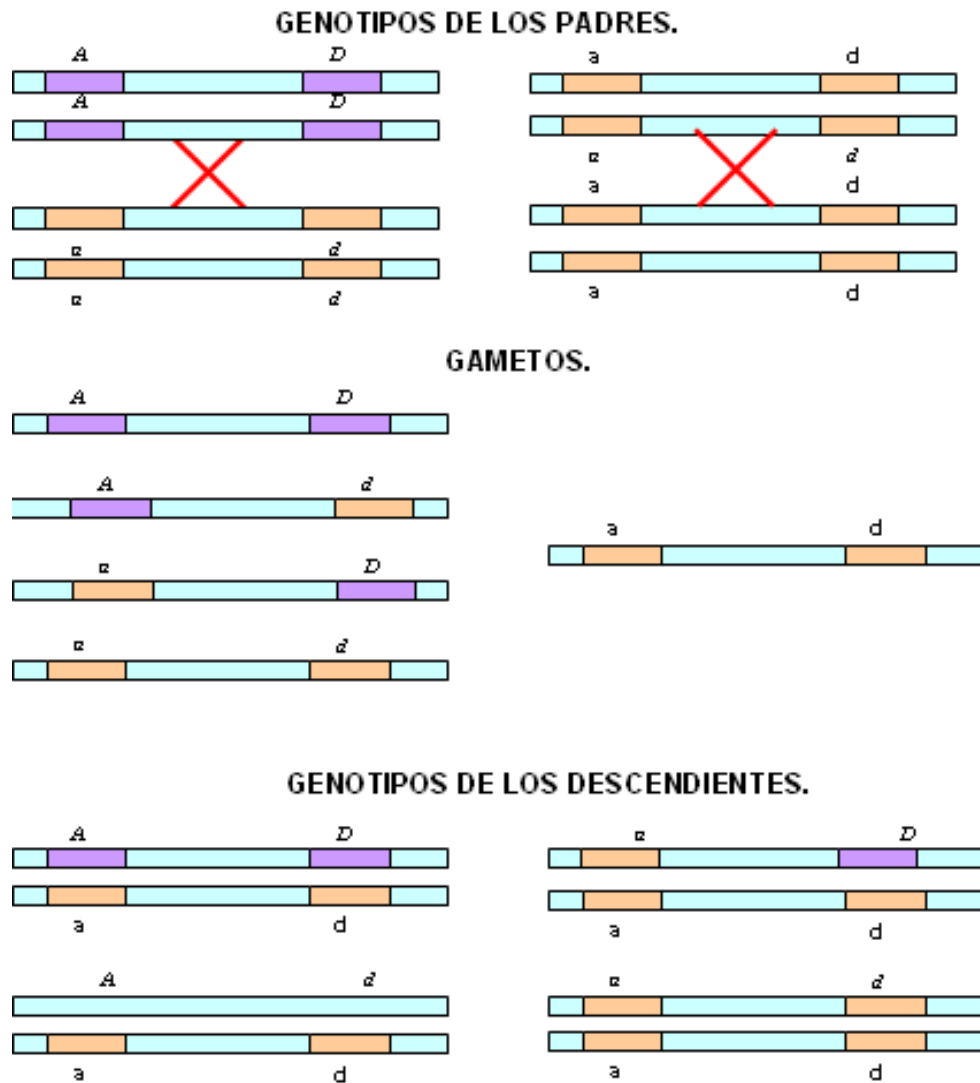


Figura 13.2. Cruce entre dos organismos cuyos caracteres están determinados por genes muy separados en el mismo cromosoma. La distancia entre los genes permite un entrecruzamiento muy frecuente, de manera que origina gametos recombinantes en la misma proporción que los no recombinantes. Los descendientes mostrarán fenotipos parentales y recombinantes en la misma proporción, 25% de cada uno.

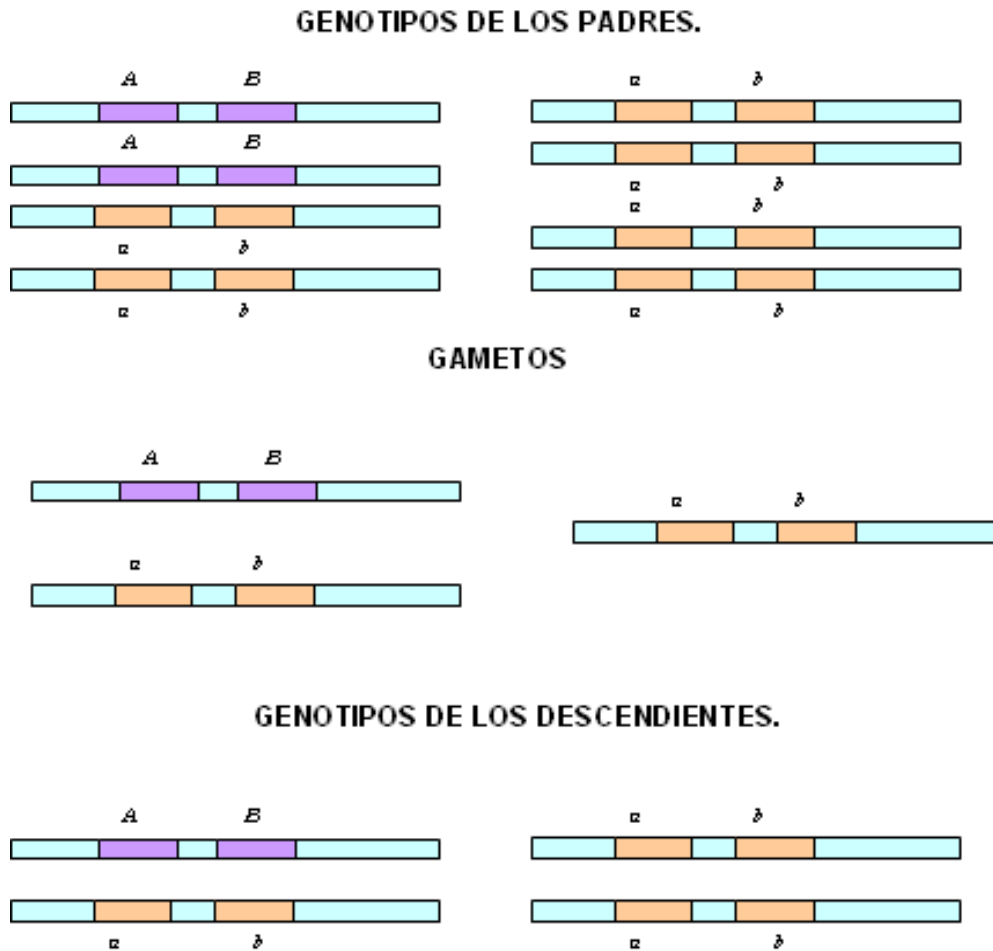


Figura 13.3. Cruce entre dos organismos cuyos caracteres están determinados por genes ubicados muy cercanos en el mismo cromosoma. La distancia entre los genes es tan corta que no es posible el fenómeno de entrecruzamiento y los genes segregan juntos hacia los gametos. Los descendientes reproducen los fenotipos paternos en un 50% de cada uno. No hay fenotipos recombinantes.

Una tercera posibilidad es que los genes estén a una distancia intermedia, ni tan alejados como en el primer caso, ni tan cercanos como en el segundo. Esta distancia media hace que el evento de entrecruzamiento entre los dos genes sea menos frecuente y por

tanto los fenotipos recombinantes que se obtienen en la descendencia sea menor al 25% observado en el primer caso (Fig. 13.4). En ese caso se dice que entre los genes existe un ligamiento incompleto.

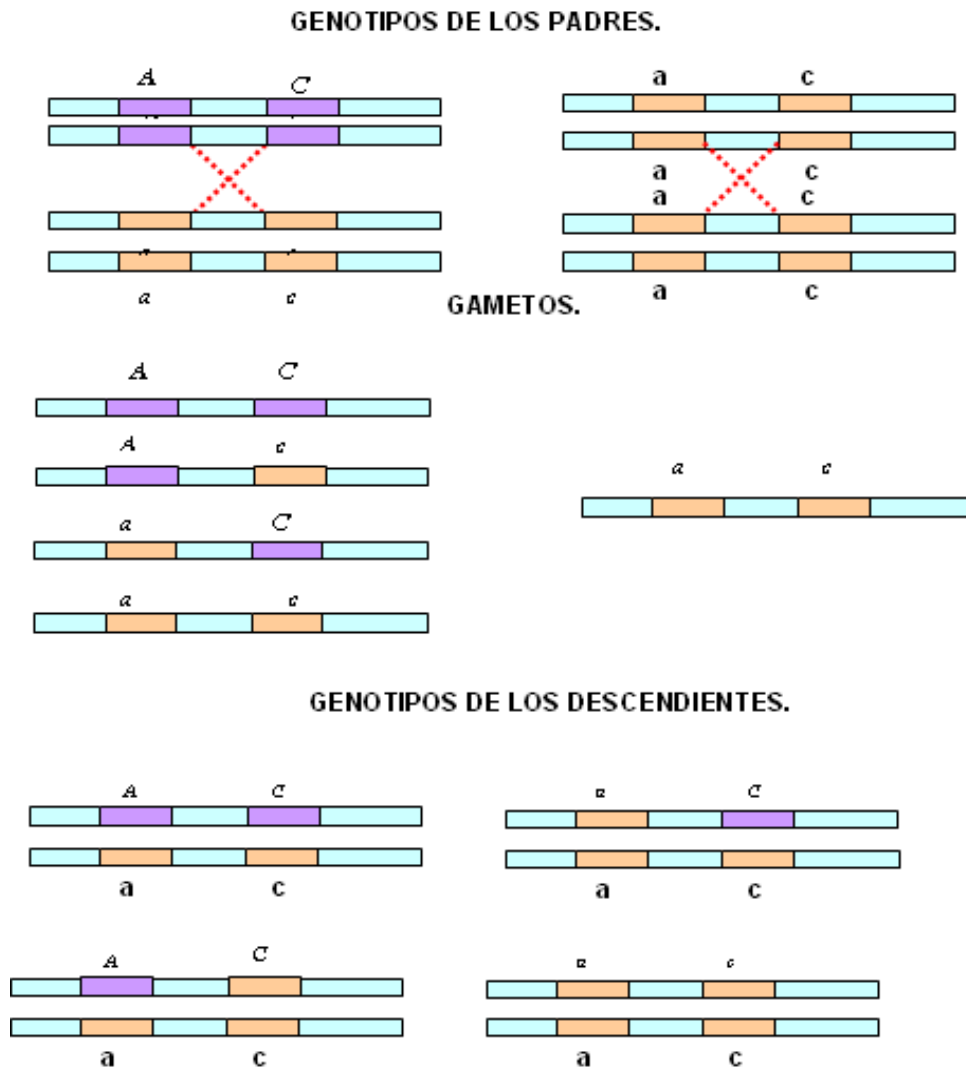


Figura 13.4. Cruce entre organismos con caracteres cuyos genes están medianamente separados en el mismo cromosoma. Aunque parece igual al primer cruce, la diferencia estriba en que el evento de entrecruzamiento es menos frecuente y por tanto los gametos que portan los genes recombinados están en menor proporción y por lo tanto originan un menor número de descendientes.

En el caso del ligamiento Incompleto en la progenie aparecen 4 tipos de hijos, 2 no recombinantes, que aparecen siempre en mayor proporción numérica (podría ser el 80%) y 2 recombinantes, que aparecen siempre en menor cantidad numérica (sería el 20%).

## **CÁLCULO DE LA FRECUENCIA DE RECOMBINACIÓN Y FASE DE POSICIÓN ENTRE GENES LIGADOS**

Cuando los genes situados en un cromosoma están ligados se puede calcular la distancia aproximada entre los genes mediante lo que se llama frecuencia de recombinación (FR)

Esta se calcula:

$$FR = \frac{\text{Número de hijos recombinantes}}{\text{Número total de hijos}}$$

En el caso del primer cruce la frecuencia de recombinación es:

$$FR = \frac{50 \text{ hijos recombinantes}}{100 \text{ hijos totales}} = 0,5 \text{ o } 50\%$$

En el segundo cruce:

$$FR = \frac{0 \text{ hijos recombinantes}}{100 \text{ hijos totales}} = 0$$

En el tercer cruce:

$$FR = \frac{20 \text{ hijos recombinantes}}{100 \text{ hijos totales}} = 0,2 \text{ o } 20\%$$

Así la frecuencia de recombinación es un dato numérico teórico de la distancia física entre los genes que tiene un valor predictivo en el caso de que entre los genes analizados exista una distancia tal que no se cumple lo esperado según la segunda Ley de Mendel.

No obstante, la FR no ofrece un valor real de la distancia entre los genes, porque en el caso del ligamiento completo, como no aparecen hijos recombinantes la  $FR=0$ , pero entre 2 genes no puede existir una distancia de cero, ya que dos cosas no pueden ocupar el mismo espacio físico. Cuando entre los genes se cumplen la Ley de Segregación Independiente la FR es de 50%, pues la mitad de los hijos son recombinantes, pero todos los genes que se ubican en un cromosoma no pueden tener una distancia de 50 unidades de recombinación, ya que existirán genes más alejados.

Esto nos indica que la distancia que brinda la FR es una medida teórica de aproximación y no un valor real de longitud, pero sí nos define si entre los genes de los loci estudiados existe ligamiento completo o incompleto.

En resumen la FR nos permite llegar a las siguientes conclusiones:

- . Si FR es igual a 0, entre estos genes existe Ligamiento Completo.
- . Si FR es igual a 50, se cumple la Ley de Segregación Independiente y por lo tanto no existe ligamiento entre los genes.
- . Si FR es mayor que 0 pero menor que 50, entonces entre los genes existe un ligamiento incompleto.

Otro aspecto que hay que tener en cuenta cuando se estudian genes ligados es la ubicación de estos en los cromosomas homólogos, lo que se designa con el nombre de fase.

Retomemos el ejemplo del tercer cruce prueba. En este caso uno de los padres es doble heterocigótico. Pudiera entonces haber dos situaciones en relación con la ubicación de los genes; bien que los dos genes que determinan los caracteres dominantes estén en el mismo cromosoma, bien que se encuentren en cromosomas homólogos. En el primer caso ambos genes fueron heredados del mismo progenitor y en el segundo fueron heredados de progenitores diferentes.

Cuando los dos genes que determinan los caracteres que se están estudiando (en este caso los dominantes) se encuentran en el mismo cromosoma se dice que están en acoplamiento o en cis. Cuando están en cromosomas homólogos se dice que están en repulsión o trans.

Para diferenciar estas dos situaciones se debe realizar un retrocruce. Si en los resultados de éste se observa que los individuos no recombinantes reproducen los fenotipos paternos, entonces los genes bajo estudio se encontraban en acoplamiento (Fig. 13.5).

Si por el contrario son los descendientes recombinantes los que reproducen los fenotipos paternos, los genes bajo estudio están en repulsión (Fig. 13.6).



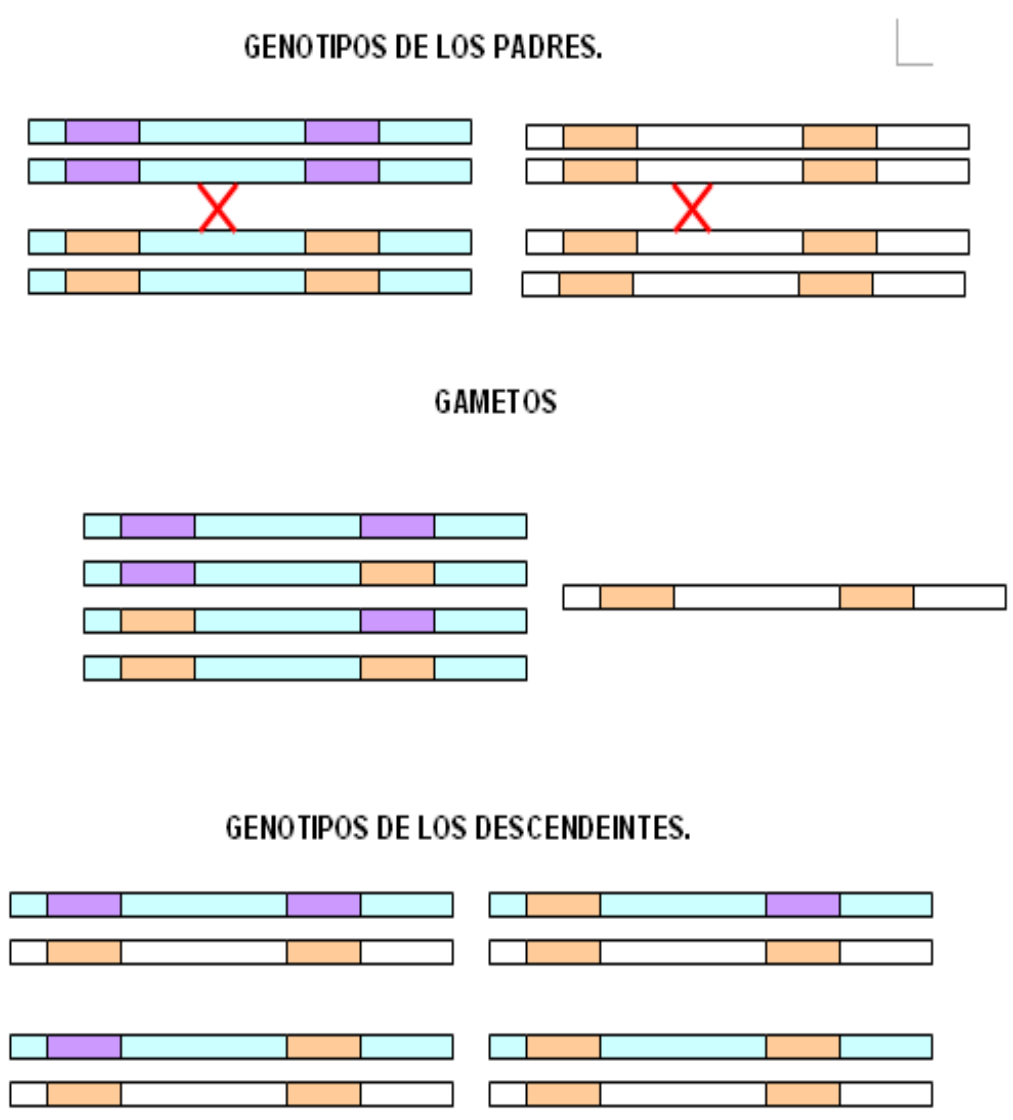
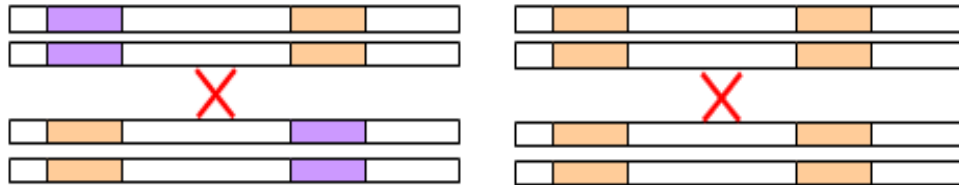


Figura 13.5. Genes en acoplamiento. Cuando los genes bajo estudio están en acoplamiento los descendientes no recombinantes (cromosomas como rectángulos azul pálido) reproducen los fenotipos paternos.

**GENOTIPOS DE LOS PADRES.**



**GAMETOS.**



**GENOTIPOS DE LOS DESCENDENTES.**

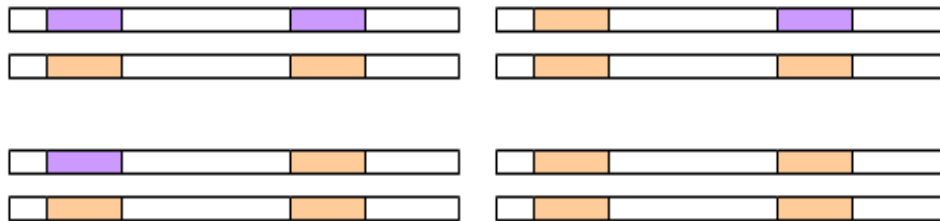


Figura 13.6. Genes en repulsión. Cuando los genes bajo estudio están en repulsión los descendientes recombinantes (cromosomas con rectángulo azul pálido) reproducen los fenotipos paternos.

## LOCALIZACIÓN DE GENES LIGADOS

Existe un tipo de estudio que permite establecer la posición relativa de varios genes en un cromosoma, este método se llama test de tres puntos.

En el ejemplo siguiente se demuestra cómo calcular la posición de varios genes diferentes ubicados en el cromosoma X de la mosca *Drosophila melanogaster*.

Existen 3 genes diferentes ubicados en el cromosoma X de esta especie de mosca que son:

GEN	CARACTERÍSTICA
sc	Forma del cuerpo alargada.
+	Forma del cuerpo normal.
v	Alas sin venas.
+	Alas con venas normales.
eq	Falta de pelos (quetas) en el cuerpo.
+	Cantidad normal de pelos en el cuerpo.

Nota: El signo + se utiliza en caracteres de animales y plantas para representar al alelo normal o no mutado y se llama silvestre, este alelo domina sobre los alelos mutados.

Si cruzamos una hembra (XX) con fenotipo silvestre pero heterocigótica para los tres genes mutados con un macho (XY) que presenta el fenotipo mutado por ser hemicigótico para los 3 genes mutados podemos observar la descendencia de machos de este cruce que serán los que expresaran en su fenotipo la combinación de genes producidos por entrecruzamiento o no entre los cromosomas X de la madre, así:

hembra heterocigótica  
fenotipo silvestre

macho hemicigótico  
cuerpo alargado,  
alas sin venas y cuerpo  
sin pelos

sc v eq / + + +

sc v eq

Descendencia de machos (genotipos hemicigóticos)

FENOTIPOS	GENOTIPOS	No DE HIJOS
1)Cuerpo Alargado, Alas sin Venas y Cuerpo sin pelos	sc v eq	8576
2)Silvestre	+ + +	8808
3)Cuerpo Alargado	sc + +	681
4)Alas sin venas y cuerpo sin pelos	+ v eq	716
5)Cuerpo Alargado y alas sin venas	sc v +	1002
6)Cuerpo sin pelos	+ + eq	997
7)Cuerpo Alargado y sin pelos	sc + eq	4
8)Alas sin venas	+ v +	1
Total de descendientes.		20785

Los fenotipos 1 y 2 son no recombinantes, pues cada uno de ellos expresa los caracteres que aparecen en cada uno de los cromosomas X de la madre sin entrecruzamiento. En total se obtuvieron (8 576 + 8 808) 17 384 no recombinantes.

Los fenotipos 3 y 4 son el resultado de recombinaciones entre sc y v, lo que dio lugar a dos combinaciones diferentes a la de los padres en (681 + 716) 1 397 descendientes.

También 5 y 6 son recombinantes entre los genes v y eq, produciendo (1 002 + 997) 1 999 hijos con combinaciones nuevas diferentes a la de los padres.

Por su parte los grupos 7 y 8 se producen por doble entrecruzamiento entre sc-v-eq, también son recombinantes pues presentan otras combinaciones génicas nuevas diferentes de las observadas en los padres, en un total de (4 + 1) 5 descendientes.

Calculemos la Frecuencia de Recombinación (FR) entre los genes:

$$\text{FR entre sc-v} = \frac{1716}{20785} = 6,72\%$$

$$\text{FR entre v - eq} = \frac{1999}{20785} = 9,72\%$$

$$\text{FR dobles recombinantes (DR)} = \frac{5}{20785} = 0,02\%$$

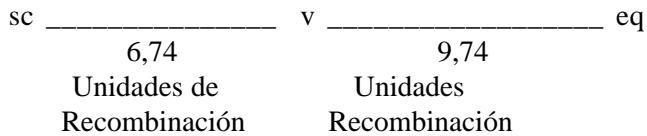
Con estas cifras podemos dibujar el mapa de ligamiento entre estos 3 genes

Distancia entre

$$\text{sc-v} = \text{FR sc-vI} + \text{FR DR} \\ 6,72 + 0,02$$

Distancia entre

$$\text{v - eq} = \text{FR v-eq} + \text{FR DR} \\ 9,72 + 0,02$$



sc  $\xrightarrow{16,38}$  eq

16,38

La distancia entre sc - v nos da la suma entre la FR entre los genes sc y v (6,72) y la FR de los dobles recombinantes que es 0,02. La distancia entre los genes v - eq nos da la FR entre los genes v - eq (9,72) más la FR de los dobles recombinantes que es 0,02. La distancia en sc - eq es la suma de las distancias entre sc - v = 6,74 + distancia entre v - eq = 9,74 que es de 16,38 unidades de recombinación.

El número de hijos dobles recombinantes observados no es la cantidad exacta de dobles entrecruzamientos que pueden ocurrir teóricamente. Para definir el número de dobles entrecruzamientos esperado basándonos en las distancias que existen entre los 3 genes se calcula:

Número de entrecruzamientos entre sc --- v = 0,0672 (FR regI)

Número de entrecruzamientos entre v --- eq = 0,0972 (FR reg II)

Número de dobles entrecruzamientos esperados = 0,0672 X 0,0972 = 0,00626

Conociendo el número de dobles entrecruzamientos esperado se puede calcular la coincidencia que existe entre el número de los dobles entrecruzamientos observados y los esperados.

Coincidencia =  $\frac{\text{Número dobles entrecruzamientos observados}}{\text{Número dobles entrecruzamientos esperados}} = 0,02$

$\frac{\text{Número dobles entrecruzamientos esperados}}{\text{Número dobles entrecruzamientos esperados}} = 0,00626$

Coincidencia = 3,22 %

Esto significa que se observó el 3,22% de los dobles entrecruzamientos esperados o sea, los esperados y los observados coincidieron sólo en el 3,22%, por tanto el 96,78% de los dobles entrecruzamientos fueron interferidos.

Se debe esperar que ocurran el 100 % de los dobles entrecruzamientos, como solamente se observó el 3,22 % de lo esperado la interferencia fue del 96,78 %.

## **FACTORES QUE PUEDEN AFECTAR EL ENTRECRUZAMIENTO EN ANIMALES Y PLANTAS**

Edad Materna: Disminuye el entrecruzamiento

Temperatura: Temperaturas por encima o por debajo de 22oC aumentan el entrecruzamiento.

Citoplasma: Factores citoplasmáticos que regulan el entrecruzamiento.

Nutrición: Desnutrición disminuye el entrecruzamiento

Iones de calcio: disminuyen el entrecruzamiento

Agentes Químicos: Agentes Quelantes aumentan el entrecruzamiento.

Algunos Antibióticos: Aumentan entrecruzamiento

Rayos X: Aumentan el entrecruzamiento

## **ANÁLISIS DE LIGAMIENTO EN EL HOMBRE**

El estudio de ligamiento en el hombre es una de las áreas de la Genética Médica que se ha expandido más rápidamente a partir de la década del '60. Estos estudios permiten identificar la localización cromosómica de genes causantes de enfermedades genéticas y esta información puede ser aplicada al diagnóstico de una enfermedad, al aislamiento de genes específicos y al Asesoramiento Genético.

El estudio de genes ligados en el hombre presenta 2 dificultades:

1. No posibilidad de dirigir los cruces entre las personas.
2. El pequeño tamaño de la familia humana

No obstante estas dificultades existen 2 formas diferentes de estudios:

*Localización física:* Usa una variedad de métodos para definir la ubicación de genes en un cromosoma específico. Con estos métodos se puede construir mapas de posición de genes que reflejen la distancia física entre los genes ubicados en un cromosoma.

*Localización genética:* Se basa en el uso de técnicas genéticas que construyen mapas presentando la posición de genes y otras secuencias del genoma. Estas técnicas incluyen estudios mediante árboles genealógicos y con herramientas de Biología Molecular

### **Construcción de mapas físicos**

La construcción de mapas físicos comenzó a realizarse partiendo del estudio de un número grande de familias para caracteres que se heredan por un patrón recesivo ligado al cromosoma X, por la facilidad que ofrece este patrón de herencia de que a partir del genotipo de los hijos varones se puede saber el genotipo de los genes localizados en el cromosoma X en la madre.

Este método es lento y complicado por la necesidad de estudiar un número grande de familias que tengan variantes génicas detectables, que permitan establecer el ligamiento en genes ubicados en el cromosoma X. Por ejemplo, el gen de la hemofilia y la ceguera a los colores, que están ligados.

En genes ubicados en los autosomas el estudio es más complejo aún, pues los estudios familiares para caracteres autosómicos requieren mayor número de familias y cálculos matemáticos complejos, que indiquen una mayor probabilidad de ligamiento entre dos genes.

En la década de los años 60 se desarrolló una metodología que permite obtener células somáticas híbridas entre 2 especies diferentes.

Los primeros estudios con resultados favorables se realizaron en células somáticas de hombre y ratón. Se observó que con la introducción en el medio de cultivo del virus Sendai se favorece la fusión del núcleo de la célula del ratón y el de la célula humana, formando lo que se denomina un heterocarionte. ( Fig. 13.7 ).

Cuando los núcleos de ambas especies se fusionan en un mismo núcleo, los cromosomas de las dos especies coexisten en el mismo núcleo. Una característica de este híbrido somático es que los cromosomas del hombre se van perdiendo uno a uno en cada división celular, mientras que los cromosomas del ratón permanecen en el núcleo. Por estudios de los cromosomas del híbrido somático se puede ir definiendo los cromosomas humanos que se han ido perdiendo en el híbrido. Si tomamos una célula de ratón incapaz de sintetizar la enzima hexosaminidasa A y la hibridamos con una célula humana capaz de sintetizar esa enzima, se va siguiendo la presencia de actividad de esta enzima en el híbrido somático y los cromosomas que van quedando en el híbrido, cuando se pierda el cromosoma donde está ubicado el gen que codifica la síntesis de hexosaminidasa A, la célula híbrida morirá por la deficiencia de la enzima, pues la célula de ratón usada para el híbrido no sintetiza esa enzima.

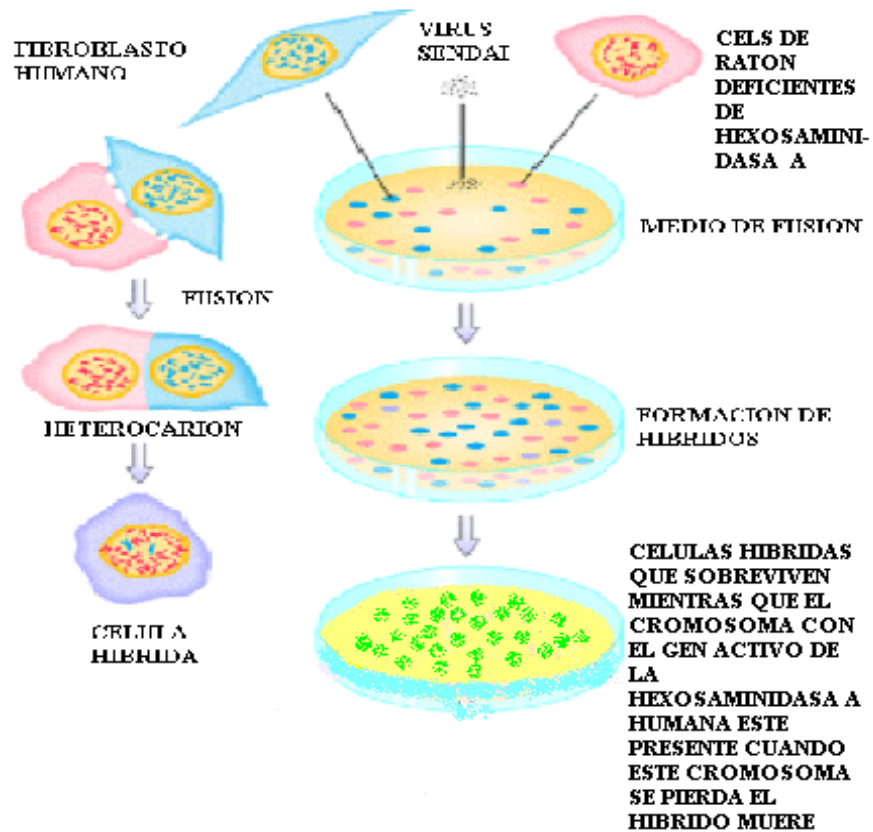


Figura 13.7. Se representa la formación de híbridos somáticos usados para el mapeo físico de genes. Se muestra el uso del virus sendai para producir células con dos dotaciones cromosómicas de diferentes especies o de dos individuos de una especie

Con este método se localizó el gen de la hexosaminidasa A en el cromosoma 15; el gen de la hipoxantina fosforibosil transferasa en el cromosoma X.

En la actualidad los estudios de híbridos somáticos para la construcción de mapas físicos de genes en el hombre han introducido técnicas más modernas de estudio cromosómico, como tinción de cromosomas con colorantes fluorescentes que hacen más fácil el reconocimiento de cada cromosoma específico.



Estudios con híbridos de células somáticas en los cuales los cromosomas humanos pueden presentar aberraciones en su estructura, que permiten ubicar a genes a partir de su producto de expresión. No sólo en un cromosoma específico sino en zonas específicas del cromosoma como en el brazo corto, en el brazo largo e incluso en bandas específicas de un cromosoma.

También se están estudiando híbridos de células somáticas que son mantenidas en cultivo, que pertenecen a un paciente que presenta hasta tres enfermedades genéticas diferentes y así pueden ubicarse estos genes en un cromosoma específico y en zonas específicas del cromosoma.

La construcción de mapas físicos que usan híbridos de células somáticas son métodos indirectos que requieren la selección de células humanas con diferentes características como aberraciones cromosómicas, pacientes con 2 o más enfermedades genéticas y marcadores bioquímicos que puedan ser detectados por lo que resultan estudios complejos. En la actualidad con el desarrollo de las técnicas de Biología Molecular se han desarrollado métodos más sensibles y con mayor resolución para construir mapas físicos de los cromosomas en el hombre.

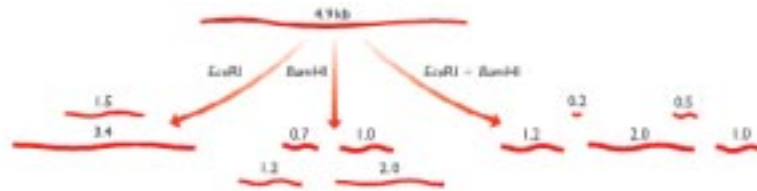
*Mapas de restricción:* Este ubica la posición relativa de una secuencia de ADN mediante el uso de endonucleasas de restricción

*Hibridación in situ fluorescente (FISH):* Mediante esta técnica se localizan marcadores en un segmento de ADN, con una sonda, la cual es construida artificialmente en el laboratorio con una secuencia nucleotídica conocida que sirve para hibridar con el segmento de ADN complementario a su secuencia en el cromosoma (Capítulo 7).

*Mapas por restricción:* Este mapeo utiliza marcadores genéticos que pueden ser localizados por la posición de sitios polimórficos (muy variables en cuanto a su secuencia nucleotídica) que son cortados por enzimas de restricción específicas.

La forma más sencilla de construir un mapa de restricción es comparar el tamaño de los fragmentos que se producen cuando se corta un fragmento de ADN con dos diferentes enzimas de restricción. Un ejemplo es presentado en la Figura 13.8.

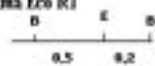
Analizando la figura 13.9 primero el ADN se digiere por la enzima EcoR1 y los fragmentos que aparecen se miden mediante electroforesis en gel de agarosa. Luego la molécula es digerida con la enzima BamH1 y los fragmentos resultantes se miden de igual forma. Los resultados de estas mediciones nos demuestran un número de fragmentos de restricción producidos por cada enzima. Esto origina un polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción, que son secuencias que se caracterizan por tener sitios específicos de reconocimiento para las endonucleasas de restricción (enzimas de naturaleza bacteriana las cuales cortan el ADN en secuencias específicas, cada enzima tiene una secuencia de corte y se denominan según la bacteria o microorganismo de las cuales se obtiene.) (Ver Capítulo 12)



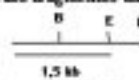
**INTERPRETACION DEL MAPA DE RESTRICCIÓN**

**FRAGMENTOS CONCLUSIONES**

0,2 y 0,5 kb producidos por la acción conjunta de ambas enzimas Estos deben aparecer por el corte de las dos enzimas del fragmento de 0,7 kb que produce la enzima Bam HI sola y este fragmento contiene un sitio de restricción que reconoce la enzima Eco RI



1,0 kb aparece cuando corta Bam HI sola Este fragmento no es cortado por Eco R I, BamHI corta el fragmento de 1,5 kb que produce Eco RI en dos fragmentos uno de 1,0 kb y otro de 0,5 kb.



1,2 y 2,0 kb solo aparecen cuando BamHI corta Estos fragmentos no tienen en su interior ningún punto de corte para la enzima EcoRI, y pueden ser los fragmentos de corte que hace BamHI cuando corta el fragmento de 3,4 kb que produce EcoRI sobre la secuencia estudiada.

Así se pueden inferir dos mapas



De las cortes realizadas por la enzima BamHI se puede predecir lo siguiente:  
 Si el mapa 1 es correcto los productos de la restricción parcial debían medir 0,7 + 1,2 = 1,9  
 Si el mapa 2 es correcto los productos de la restricción parcial debían medir 0,7 + 2,0 = 2,7  
 Los fragmentos que produce BamHI en condiciones subóptimas incluye un fragmento de 2,7 kb

Por lo que podemos concluir que el mapa 2 es el correcto

Figura 13.8. Mapeo de restricción: el objetivo es mapear sitios con las enzimas de restricción Eco RI (e) y Bam HI (b) en un fragmento lineal de 4,9 kb. Los resultados de la acción de 1 o las 2 enzimas como se presenta en la parte superior de la figura. Los tamaños de los fragmentos que aparecen después del corte por ambas enzimas nos permiten construir un mapa según se explica en la parte inferior de la figura. No queda claro la posición de uno de los tres sitios de restricción que surgen de la acción de la enzima bam h1. (Tomado de [www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi/) libro t.a.Brown Genomes 2da ed. Capítulo 5 eds bios scientific publishers ltd 2002 )



Figura 13.9. Cuando se hace la digestión parcial con la enzima Bam H1 se indica que el mapa II es el correcto. (Tomado de [www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi/) libro t.a. Brown Genomes 2da ed. Capítulo 5 eds bios scientific publishers ltd 2002 )

### *HIBRIDACION IN SITU CON SONDAS RADIOACTIVAS O FLUORESCENTES*

La Hibridación in situ es una versión del análisis de hibridación en la cual un cromosoma intacto se examina por segmentos artificiales de ADN marcados. La posición en el cromosoma donde se hibrida el segmento o sonda de ADN de secuencia conocida nos da la información sobre la localización cromosómica de esta. (Figura 13.10). Para el método de trabajo, el ADN en el cromosoma a ser hibridado debe estar en estado de simple cadena y para esto es necesario desnaturalizarlo. El método más usado para alcanzar la desnaturalización del cromosoma es secarlo en un porta objeto de cristal y tratarlo con formamida.

Al inicio del uso de la hibridación in situ las sondas de ADN eran marcadas con isótopos radioactivos como el  $^{32}\text{P}$  y con posterioridad comenzó a usarse el tritio  $^3\text{H}$  que tiene una mayor resolución y sensibilidad. En los años 80 se introdujeron sondas de ADN marcadas con colorantes fluorescentes que han mejorado más aún la sensibilidad y resolución de estas técnicas. La Hibridación in situ se comenzó utilizando cromosomas metafásicos en los cuales el ADN se encuentra muy condensado por lo que las sondas que hibridan con los cromosomas tienen que ser muy grandes del orden de 1 a 2 millones de pares de bases (1 ó 2 Mb).

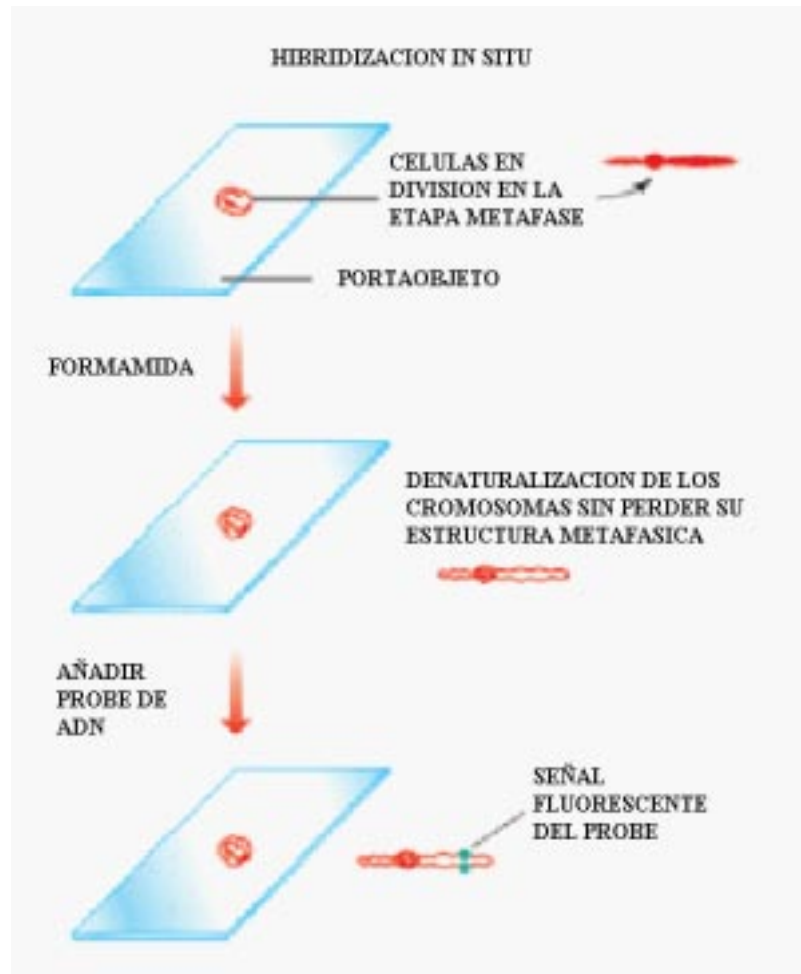


Figura 13.10. Hibridación in situ de cromosomas humanos con fragmentos de ADN lineales de secuencia conocida y marcados con colorantes fluorescentes que permiten detectar la posición física dentro de un cromosoma de un fragmento o gen conocido. (Tomado de [www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi/) libro Genomes t.a.Brown eds Bios Scientific Publisher Ltd , Oxford, UK 2002 capítulo 5 )

Desde los años 90 se comenzaron a desarrollar diferentes técnicas que usan cromosomas interfásicos y prometafásicos lo que va disminuyendo el estado de contracción del ADN en estos y permite reconocer la ubicación de secuencias específicas en un cromosoma con tamaños mucho menores del orden de 10 a 50 pares de bases lo que hace a estas técnicas más sensibles y resolutivas en sus resultados. (Figura 13.11).

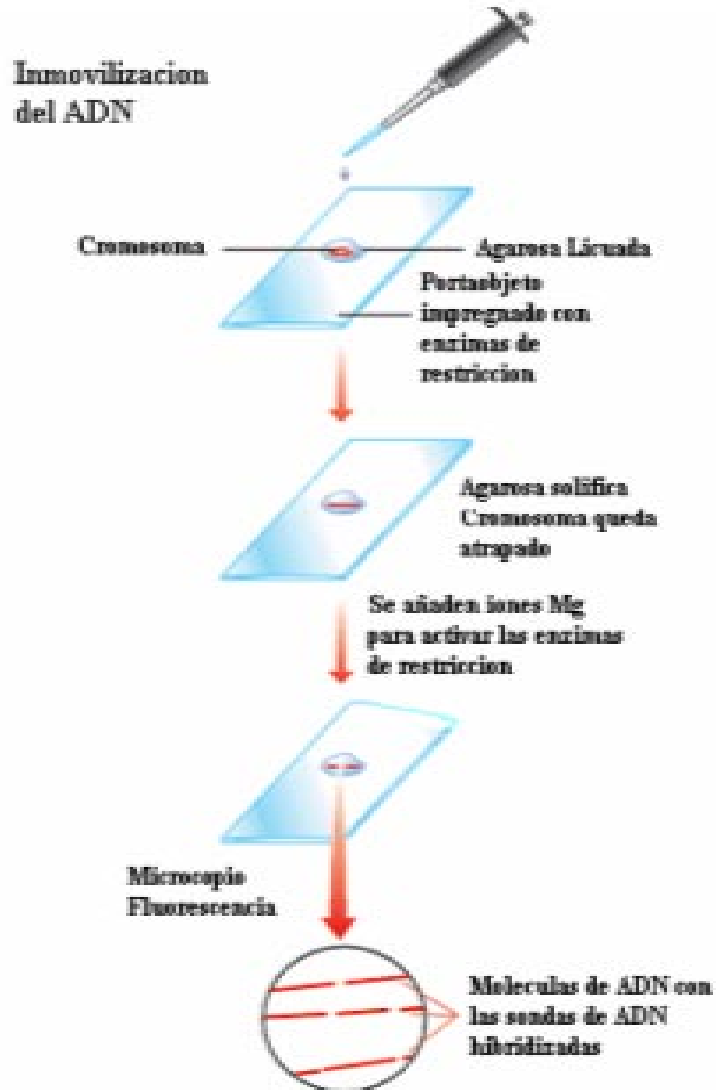


Figura 13.11. Se muestra otra técnica de hibridación in situ que se coloca agarosa licuada con cromosomas en un portaobjeto tratado con enzimas de restricción, la agarosa solidifica y los cromosomas quedan atrapados se le añade iones magnesio para que la estructura cromosómica se active e hibridize con sondas de ADN conocidas marcadas con colorantes fluorescentes. (Tomado de [www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi/) libro t.a. Brown Genomes 2da edición capítulo 5 eds. Bios Scientific Publishers, Oxford, Uk 2002 )

## Mapas genéticos

Este nos brinda más información que el mapa físico pues aunque este último ha desarrollado técnicas de alta resolución, el mapa genético nos brinda una visión más exacta de la segregación de 2 genes (que se encuentran ligados) a través de las generaciones de una familia o de un grupo de familias con características genéticas específicas y nos posibilita localizar más exactamente un gen causante de una enfermedad heredable, que sin estos métodos sólo se pueden estudiar por su expresión fenotípica.

El análisis de ligamiento es un método muy valioso para la genética Humana y la Médica, pues brinda la posibilidad de identificar, localizar y diagnosticar genes causantes de enfermedades genéticas que no han sido detectados por métodos bioquímicos o moleculares.

Este estudio para obtener resultados debe partir de una familia que sea informativa porque en esta se puede detectar la forma de transmisión del gen de interés médico cuya expresión fenotípica es difícil de establecer por diferentes razones como:

- . Carencia de Penetrancia
- . Expresión Fenotípica Tardía
- . Signos Clínicos no certeros ( Heterogeneidad clínica y genética)

No obstante, la existencia de estas dificultades puede estudiarse la segregación del gen de interés médico si éste está ligado a un "marcador genético" (Capítulo 14).

Los genes son marcadores muy útiles en la construcción de mapas genéticos y lo hemos demostrado en los acápites anteriores cuando analizamos los cruces pruebas, pero también tenemos que reconocer que no son estos estudios totalmente ideales. Un problema que se presenta al usar estos métodos en animales y plantas es que los mapas basados en la expresión fenotípica no son muy detallados.

Esto hace considerar que la localización de genes requiere de marcadores más eficaces, las zonas de ADN que pueden ser identificadas, aunque no sean genes expresables, se denominan marcadores de ADN, como un gen es un marcador, una secuencia de ADN necesita tener al menos 2 alelos para ser útil en el estudio de mapeo.

Existen 3 secuencias que satisfacen las características necesarias para ser marcadores de ADN, se producen por la acción de las enzimas de restricción sobre las diferentes secuencias del genoma y estas son:

Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) (Ver Capítulo 12 y 14) Estos se obtienen por la acción de las enzimas de restricción y presentan variabilidad alélica, si se encuentran flanqueando a un gen de interés médico se pueden usar para ubicación en el cromosoma. (Figura 13.12).

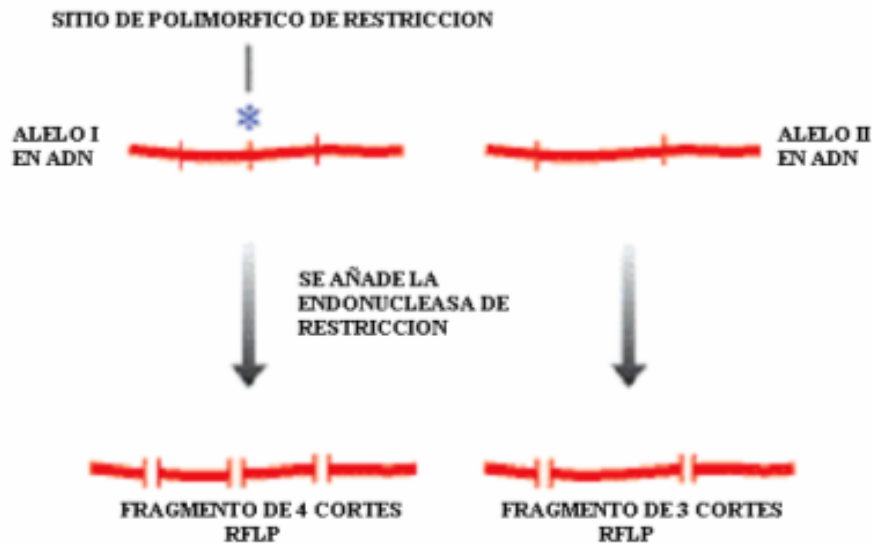


Figura 13.12. Sitios de restricción: Se forman por la acción de enzimas de restricción que reconocen una zona polimórfica en un fragmento lineal de ADN que está marcado con un asterisco en la figura. La enzima de restricción específica corta la zona polimórfica produciendo 4 fragmentos de ADN, con otra enzima de restricción no específica para cortar el fragmento polimórfico del mismo fragmento de ADN se producen solo 3 zonas de corte. (Tomado de [www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi/) libro t.a. Brown Genomes 2da ed. capítulo 5 eds Bios Scientific Publishers Ltd 2002 )

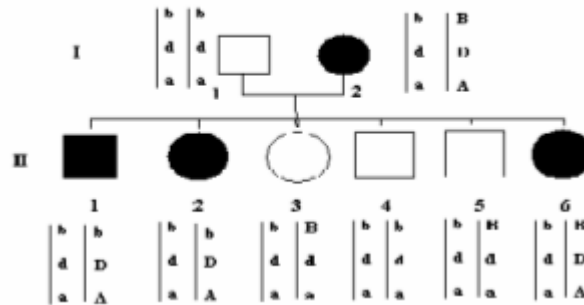
Secuencias polimórficas largas o Simple Sequence Length Polymorphism ( SEP ): Son secuencias repetitivas con variaciones en su longitud, la variabilidad alélica está dada por las diferentes longitudes de las secuencias repetitivas. A diferencia de los RFLP los SEP pueden ser multialélicos, existen dos tipos:

Minisatélites: También llamados Zonas Repetitivas en Tándem de Número Variable (Variable Number of Tandem Repeats) (VNTR) en las cuales la unidad de repetición tiene hasta 25 kb de longitud

Microsatélites: También llamados Repeticiones en Tándem Simples (Simple Tandems Repeats)(STRs): Estas son secuencias repetitivas cortas usualmente formadas por dinucleótidos o tetranucleótidos

Los más usados en los estudios en la construcción de mapas genéticos son los RFLP y los VNTR, estos últimos por ubicarse en las regiones extremas de los cromosomas, Telómeros.

Ahora ilustraremos algunos estudios de ligamiento en el hombre.  
Consideremos la siguiente familia (Figura 13.13):



LEYENDA  
 A y a Locus marcadores (Locus 1)  
 B y b Locus marcadores (Locus 2)  
 D Neuro fibromatosis tipo I  
 d Sano

Figura 13.13. Familia que presenta NF1. Relación de ligamiento del locus D (NF1) y los loci 1 y 2.

La mujer I-2 presenta una enfermedad genética llamada Neurofibromatosis 1 (NF1) que se hereda con un patrón autonómico dominante y la enfermedad tiene expresividad variable. El gen de la NF1 lo representaremos por la letra D y su alelo no mutado por d.

Este gen se encuentra en el cromosoma 17, en este mismo cromosoma encontramos en esta mujer I-2 dos loci génicos 1 y 2 representados por los alelos A,a y B,b respectivamente y que no producen ninguna enfermedad.

En esta familia se puede observar la tendencia de segregación entre el gen D (NF1) y los otros 2 loci y observamos que todos los hijos enfermos de esta mujer que expresan la enfermedad siempre que llevan el gen de la enfermedad llevan alelo A del locus marcador A y con respecto al otro locus los hijos enfermos pueden llevar al alelo B o el b indistintamente, esto nos puede hacer pensar que exista un ligamiento entre el gen de la NF 1 y el alelo dominante del locus A y que no existe ligamiento entre el gen de la NF 1 y los alelos del locus B. De esta forma en esta familia se podría predecir por la presencia del alelo A del locus 1 que el gen de la NF 1 estará presente en el individuo.

Pero como el alelo a del locus 1 no es el gen que produce la enfermedad la predicción de si estos genes están ligados o no puede ser errónea si ocurre un evento de entrecruzamiento.



La probabilidad de un diagnóstico erróneo esta dada por la posibilidad de que un entrecruzamiento ocurra entre el locus de la NF1 y el locus 1 que es equivalente a la distancia en unidades de recombinación entre ambos loci.

Esto se complica más por la expresividad variable de la enfermedad en que a simple inspección clínica puede aparecer un miembro de esta familia que exprese la enfermedad de forma tan ligera que escape al estudio clínico y haya heredado el gen afectado, pero que no sea detectado por estudio clínico.

El estudio de ligamiento requiere de que la familia sea informativa y esto está dado por la relación entre el locus que produce la enfermedad a estudiar y el otro locus que se use como marcador genético y de la fase en que se encuentren ambos loci, esto significa si los genes están en acoplamiento o en repulsión.

Para el estudio de ligamiento en humanos por estudio de familias son más útiles las familias grandes que las pequeñas, aunque si la familia es muy grande en ocasiones no es suficientemente informativa, por lo que familias con 3 generaciones se consideran más útiles que las que presentan solo 2.

Para examinar como se detecta y mide el ligamiento entre 2 loci génicos llamémosle A y B en una serie de familias. Valoremos que en los hijos de estas familias por información de la segregación meiótica de estos loci se encuentra que aparecen 80 % de hijos no recombinantes y 20 % de hijos recombinantes estos valores nos indican a priori que la distancia entre ambos loci es de 20 unidades de recombinación. El estimado sin embargo es válido solamente si el número de hijos observados en esta relación 80:20 es realmente diferente a la proporción 50:50 que aparece si no existe ligamiento entre los loci.

Para evaluar esto se debe calcular la probabilidad relativa de obtener los datos observados cuando los 2 loci están ligados en alguna fracción de recombinación que llamaremos  $r$  (sita) en comparación con la probabilidad de que estos no estén ligados. Por ejemplo si de 5 hijos, 4 son no recombinantes y 1 es recombinante la relación debe ser considerada significativamente diferente de los valores esperados para segregación independiente entre estos loci. Si uno observa que la proporción 80:20 se mantiene cuando estudia docenas de familias para estos loci génicos esto avala el ligamiento entre estos loci.

Pero realmente la certeza de esta observación debe ser calculada matemáticamente para dar una mayor confiabilidad a los valores observados. Es por ello que existe un indicador que se calcula como relación de probabilidad en varios valores de  $r$  que podemos darles valores de  $r = 0$  (ligamiento) y  $r = 0,5$  (no ligamiento) así considerando estos valores se calcula  $Z$  como:

$$Z = \frac{\text{probabilidad de que los datos coincidan con loci ligados en } r}{\text{Probabilidad de los datos si no hay ligamiento}}$$