

4 Genética bacteriana

L. Betancor, M. Gadea, K. Flores

Introducción

Las bacterias son microorganismos con una capacidad extraordinaria de adaptación a diferentes condiciones ambientales. Para comprender la esencia de esta capacidad es importante conocer sus bases genéticas, es decir como está organizada la información genética, como realizan y regulan su expresión y que mecanismos de variación génica poseen.

La capacidad infecciosa de las bacterias patógenas radica en que poseen la información genética necesaria para colonizar los tejidos del huésped, invadirlos y/o producir sustancias tóxicas que causarán la enfermedad.

Por otro lado, el conocimiento del funcionamiento genético de las bacterias, sumado al hecho de que son de fácil manejo en el laboratorio y que tienen crecimiento rápido, ha permitido usarlas para sintetizar productos útiles a la medicina, tanto para el diagnóstico como para la prevención y tratamiento de algunas enfermedades. Estas posibilidades se han visto incrementadas con el desarrollo de la ingeniería genética y la disponibilidad de técnicas de biología molecular.

Estructura del genoma bacteriano

Toda la información genética esencial para la vida de la bacteria está contenida en una única molécula de ácido desoxirribonucleico (ADN) de doble cadena y circular, cerrado por enlace covalente. Dicha molécula se denomina cromosoma bacteriano. Muchas bacterias poseen además ADN extracromosómico, también circular y cerrado, denominado ADN plasmídico por estar contenido en los plásmidos. Éstos, portan información genética para muchas funciones que no son esenciales para la célula en condiciones normales de crecimiento.

En términos bioquímicos la composición y estructura de los ácidos nucleicos bacterianos, es la misma que para cualquier célula. Conviene recordar brevemente, que los ácidos nucleicos son macromoléculas compuestas de nucleótidos unidos en forma covalente por medio de enlaces fosfodiéster entre los carbonos de las posiciones 3' y 5' de dos residuos de azúcares adyacentes. Esta estructura forma un esqueleto de azúcares y fosfatos constante en toda la macromolécula. La variación entre los nucleótidos que constituyen la cadena de ácido nucleico, esta dada por sus bases nitrogenadas; para el ADN son: adenina (A), timina (T), citocina (C) y guanina (G) y para el ácido ribonucleico (ARN) son en lugar de timina, el uracilo (U). La A y G se denominan bases púricas o purinas, mientras que T, U, y C se

denominan bases pirimidínicas o pirimidinas. Así, una cadena o hebra de ácido nucleico, tendrá una estructura primaria determinada por la secuencia de las bases que la componen.

El ADN como macromolécula, está compuesto por dos cadenas nucleotídicas o hebras antiparalelas que se enlazan entre sí formando una doble hélice. Los enlaces entre ambas hebras de ADN están determinados por puentes de hidrógeno entre las purinas de una cadena, con las pirimidinas de la otra. Entonces, la A forma dos puentes de hidrógeno con la T, mientras que la C forma tres puentes de hidrógeno con la G. Dicho fenómeno se conoce como complementariedad de bases, es decir que la A es complementaria a la T y la C lo es para la G (ver figura 1). Estos enlaces mantienen estable la estructura de doble hélice de ADN, en la cual se pueden distinguir pares de nucleótidos o pares de bases (pb). Estos pb pueden usarse como unidad de tamaño o longitud para las moléculas de ADN, de esta manera podemos decir por ejemplo que el ADN cromosómico de *Escherichia coli* tiene un tamaño de 4,2 millones de pb o lo que es lo mismo de 4.200 kilobases (Kb).

Todas las células deben enfrentarse al problema de como lograr contener en su estructura moléculas tan grandes como el ADN. Volviendo al ejemplo de *E. coli*, los 4.200 Kb de su genoma implican una longitud de 1,3 mm es decir unas mil veces la longitud de la célula. Las bacterias no poseen histonas asociadas a su genoma y en consecuencia no tienen la posibilidad de compactar su ADN en estructuras tipo nucleosomas como las células eucariotas. Por lo tanto, deben compactar su ADN de otra manera. Esto se logra porque el ADN circular cerrado es capaz de adoptar una estructura terciaria denominada superenrollamiento, que implica el enrollamiento del eje de la doble hélice sobre si mismo (ver figura 2). Este superenrollamiento se dice que tiene sentido negativo porque tiene el sentido contrario al enrollamiento de una hebra de ADN sobre la otra. Esto supone para la bacteria una fuente de almacenamiento de energía para ser usada en muchos procesos fisiológicos que la requieren, por ejemplo la separación de las dos hebras de ADN necesaria para la replicación y la transcripción.

El cromosoma bacteriano es suficientemente largo como para formar muchos lazos circulares, que como tales pueden superenrollarse formando una serie de dominios topológicos independientes. Esta organización en dominios colabora a la compactación general del genoma bacteriano e impide que, con la ruptura de una hebra (en cualquier sitio del cromosoma) se pierda el superenrollamiento total, manteniendo la energía almacenada.

Las bacterias poseen enzimas (topoisomerasas) capaces de alterar la estructura del ADN, modificando su superenrollamiento. Estas topoisomerasas actúan agregando o eliminando vueltas superhelicoidales y cumplen un rol importante en los procesos de replicación y transcripción del ADN. Además, es interesante mencionar que algunas de las topoisomerasas como la ADN girasa, son blanco de acción de los antibióticos del grupo de las quinolonas, como el ácido nalidíxico.

Los plásmidos son ADN extracromosómico

Como ya dijimos, muchas bacterias poseen información génica contenida en moléculas de ADN distintas a las del cromosoma bacteriano, denominadas plásmidos. Estos, son moléculas circulares de ADN de doble cadena que constituyen una unidad de replicación independiente del cromosoma. Por esto puede encontrarse más de una copia del mismo plásmido dentro de la célula bacteriana. En general los plásmidos de mayor tamaño se encuentran en una o unas pocas copias, mientras que los más pequeños pueden estar en hasta cien copias por célula (plásmidos multicopia).

Aunque el ADN plasmídico no porta información genética esencial para la vida de la

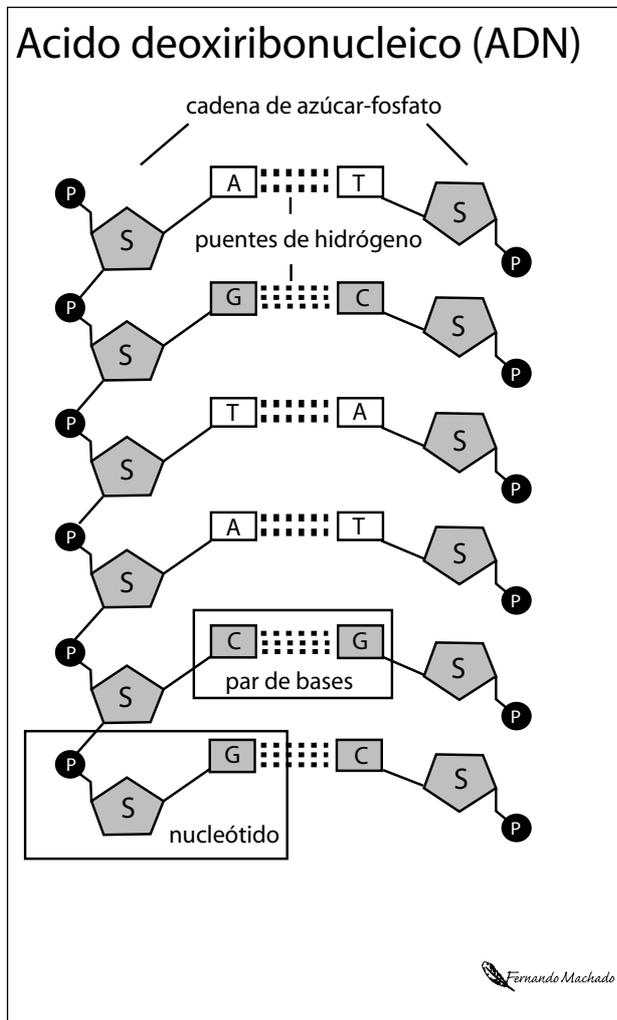


Figura 1. Estructura del ADN. Apareamiento de dos hebras de ADN basado en la complementariedad de bases. A (adenina) se aparea con T (timina) por medio de 2 puentes de hidrógeno, mientras que C (citocina) se aparea con G (guanina) por medio de 3 puentes de hidrógeno, formando los llamados "pares de bases".

bacteria, sí porta genes que le confieren nuevas propiedades fenotípicas y que en algunos casos le son útiles para su adaptación al crecimiento en determinados ambientes.

Muchas bacterias potencialmente patógenas para el hombre, solo son capaces de comportarse como tales cuando portan un plásmido que contiene genes que le permiten expresar moléculas de adhesión a los tejidos del huésped o sintetizar sustancias tóxicas para éste. Como ejemplo la toxina tetánica producida por *Clostridium tetani*, está codificada plasmídicamente.

En otros casos, los plásmidos contienen genes que codifican enzimas capaces de degradar algunos antibióticos, permitiendo que la bacteria sobreviva a la acción de los mismos. Por ejemplo la producción de β -lactamasas por cepas *Neisseria gonorrhoeae*, *Staphylococcus aureus* y *Haemophilus influenzae* está codificada plasmídicamente.

Los plásmidos pueden clasificarse según distintos criterios, por ejemplo por su tamaño, su número de copia o el tipo de genes que contiene (plásmidos de virulencia, plásmidos de resistencia a antibióticos, etc.). También pueden clasificarse en grupos de incompatibilidad;

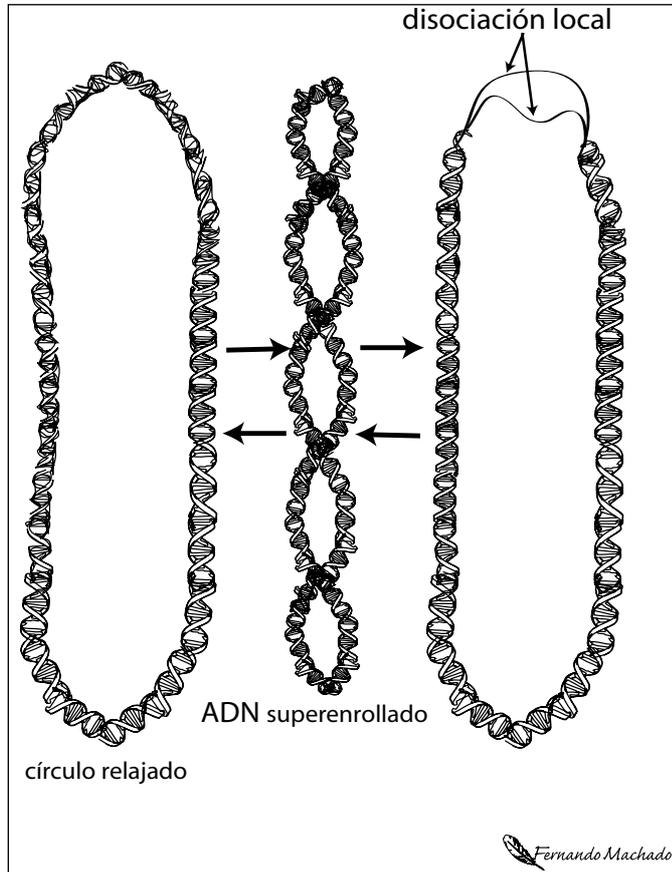


Figura 2. Superenrollamiento del ADN. Una molécula de ADN circular relajado puede ser "retorcida" para formar una molécula superenrollada negativamente. Esta reacción es catalizada por una enzima "girasa", mientras que la reacción inversa lo es por una "topoisomerasa".

se dice que dos plásmidos pertenecen al mismo grupo de incompatibilidad si son incapaces de coexistir en la misma bacteria. Muchos plásmidos, en general los de mayor tamaño (que pueden portar hasta 50 o 100 genes), suelen ser capaces de transferirse de una bacteria a otra mediante un proceso llamado conjugación (véase más adelante). Estos plásmidos de conjugación codifican todos los factores necesarios para su transferencia. Algunos plásmidos más pequeños, no conjugativos, pueden ser movilizados, es decir que poseen la secuencia necesaria para permitir su transferencia, pero ellos mismos no codifican las proteínas necesarias para ser transferidos. Por último, otros plásmidos no se transfieren en absoluto. La adquisición de ADN plasmídico por una cepa bacteriana, puede realizarse por medios distintos a la conjugación como transformación, la transducción mediada por fagos o la incorporación en el cromosoma, como veremos más adelante.

Genes "saltarines" de las bacterias

Los elementos transponibles son segmentos de ADN capaces de moverse desde una posición a otra en el genoma. Es decir que pueden transponerse o "saltar" desde un sitio determinado del genoma, separándose del resto del ADN, hasta otro sitio distinto al cual se integran. También pueden transponerse desde el cromosoma a un plásmido o viceversa o a distintos

sitios dentro de la misma molécula de ADN. Los elementos transponibles están ampliamente distribuidos en la naturaleza, tanto en virus, como en células procariontas y eucariotas. Existen dos tipos de elementos transponibles: las secuencias de inserción (elementos IS) y los transposones (Tn).

Los elementos IS son segmentos pequeños de ADN, de aproximadamente 1 a 2 Kb que contienen la información genética mínimamente necesaria para la transposición. Poseen secuencias específicas en ambos extremos del fragmento que consisten en repeticiones invertidas una respecto de la otra. Estas secuencias, son reconocidas específicamente por enzimas codificadas en el mismo elemento IS, denominadas transposasas, responsables de la integración del elemento al sitio blanco del genoma.

Los Tn son segmentos de ADN que además de portar la información necesaria para la transposición, contienen genes que pueden codificar diferentes propiedades fenotípicas. Dentro de éstas se destaca la resistencia a ciertos antibióticos, como es el caso de la resistencia de alto nivel a la gentamicina que tienen algunas cepas de *Enterococcus* sp. Algunos plásmidos poseen uno o mas Tn que portan determinantes de resistencia a antibióticos; la capacidad de estos elementos para transponerse de un plásmido a otro, proporciona a la bacteria gran flexibilidad para desarrollar resistencia, dado que dichos plásmidos son generalmente conjugativos, por lo que pueden transferirse entre distintas bacterias.

La inserción de un elemento transponible puede producir diferentes efectos sobre la expresión de la información génica como impedir la funcionalidad de un gen o activar la expresión de otro.

Replicación del ADN bacteriano

El genoma completo de una célula, sea procarionta o eucariota, debe replicarse con exactitud una vez por cada división celular. Por lo tanto, la iniciación de la replicación compromete a la célula a una división posterior. Si se inicia la replicación, la división consiguiente no debe ocurrir hasta que se haya completado la replicación y, de hecho el final de la replicación puede disparar la división celular.

Las bacterias, a diferencia de las células eucariotas, son capaces de replicar su ADN a lo largo de todo su ciclo celular.

Se denomina replicón a cada unidad de replicación del ADN que contiene todos los elementos requeridos para regular este proceso.

El cromosoma bacteriano se replica a partir de un único origen que se mueve linealmente hasta completar la duplicación total de la molécula, por lo que constituye un replicón. Esto facilita la regulación que está centrada en la etapa de iniciación; una vez que la replicación del cromosoma se inicia en su origen, todo el cromosoma será duplicado. Los plásmidos, constituyen replicones independientes del cromosoma, generando una replicación por ciclo celular que se coordina con la replicación genómica (plásmidos unicopia) o permitir varias replications por ciclo (plásmidos multicopia).

El sitio de ADN que se está duplicando, se llama horquilla de replicación. La replicación puede ser unidireccional o bidireccional, según se formen una o dos horquillas en el origen. Generalmente, los cromosomas bacterianos tienen replicación bidireccional, mientras que algunos plásmidos pueden replicarse unidireccionalmente. En la replicación unidireccional, una horquilla sale del origen y progresa a lo largo del ADN. En la bidireccional, se forman dos horquillas que se alejan del origen en direcciones opuestas hasta que se encuentran completando la duplicación. Esto permite a la bacteria duplicar su ADN más rápido que si

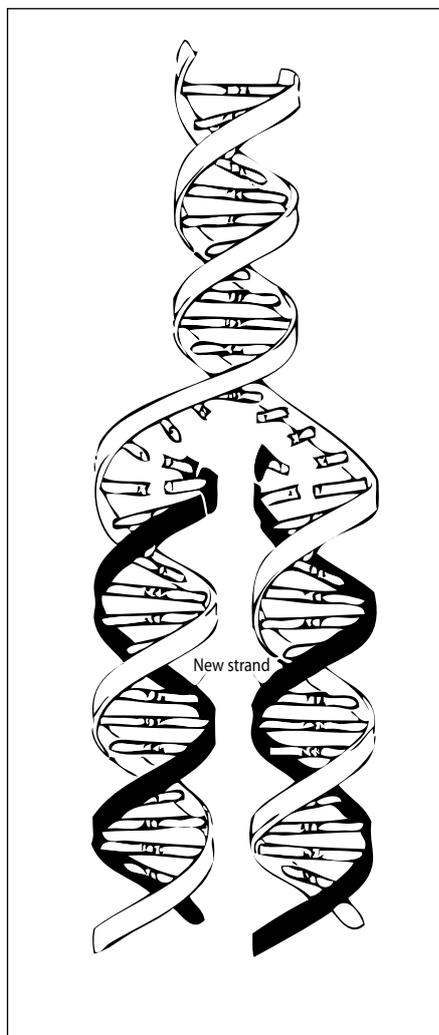


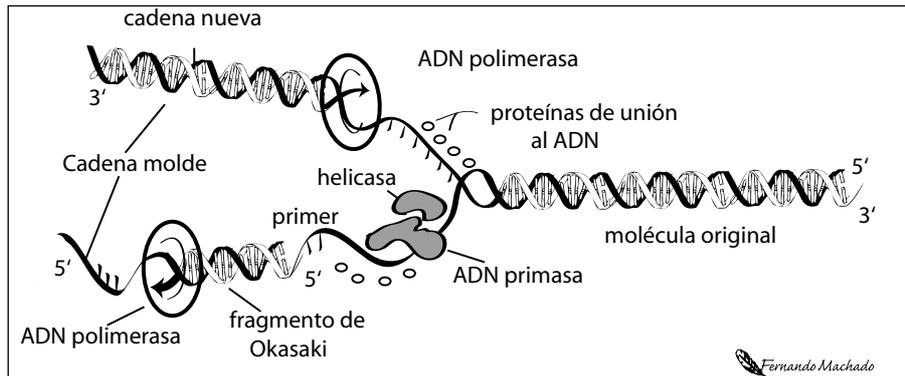
Figura 3. Replicación del ADN. El proceso de replicación del ADN es semiconservativo, ya que cada nueva molécula posee una hebra sintetizada “de novo” apareada a su complementaria proveniente de la molécula que le dio origen. El proceso genera dos moléculas de ADN idénticas.

el proceso fuera unidireccional, pudiendo replicar más de mil pb por segundo. Es importante destacar que, aunque la velocidad de replicación es muy elevada, la fidelidad de la misma también es grande, siendo la frecuencia de mutaciones espontáneas del orden de una cada 10^7 a 10^{11} pb replicados.

La replicación es semiconservativa porque cada molécula de ADN posee una cadena del ADN original y una nueva. Esto resalta la importancia de la complementariedad de bases en la estructura del ADN (ver figura 3).

Las enzimas encargadas de catalizar el proceso de replicación, se denominan ADN polimerasas. Si bien en *E. coli* se conocen tres tipos distintos, la responsable de la mayoría de los procesos de replicación es la polimerasa III, mientras que las polimerasas I y II cumplen principalmente funciones de reparación de rupturas o de errores en las moléculas de ADN. También participan otras enzimas, como las helicasas responsables de “desenrollar” el ADN en el origen o cerca de él, paso indispensable para iniciar la replicación.

Figura 4. Colaboración de proteínas en la horquilla de replicación. La ADN polimerasa III necesita para iniciar la síntesis un cebador o primer que es sintetizado por una ARN polimerasa especial. Algunas proteínas desenrollan la hélice de ADN y otras se unen a los fragmentos de ADN unicatenario para estabilizarlo. Como la polimerasa solo sintetiza ADN en dirección 5' a 3', una de las cadenas se sintetiza en forma discontinua, dejando una serie de fragmentos de ADN y de huecos sin replicar. La ADN polimerasa I rellena los huecos y una enzima ligasa sella los fragmentos entre si.



Esquemáticamente, podemos decir que la replicación consta de tres fases: iniciación, elongación y terminación. La primera se produce desde el origen del replicón donde se forma la o las horquillas de replicación, gracias a la acción de las helicasas que “desenrollan” el ADN. De esta forma se constituye una porción monocatenaria de ADN que estará en condiciones de formar un complejo con proteínas de unión al ADN, encargadas de estabilizar la cadena sencilla, evitando la formación de puentes de hidrógeno. Se sintetiza un corto oligonucleótido de ARN con un grupo 3' oxidrilo libre, que actuará como cebador o primer, en el cual la ADN polimerasa agrega los nucleótidos.

La elongación consiste en el avance de la horquilla de replicación, conforme se van agregando nucleótidos a la nueva cadena, siguiendo un orden establecido por las reglas de complementariedad de bases (A con T y C con G), entre la cadena “molde” y la nueva. En esta etapa participa fundamentalmente la ADN polimerasa III. Todas las polimerasas conocidas agregan nucleótidos en dirección 5' - 3' para el crecimiento de la cadena y requieren una cadena de ADN molde, un cebador y los nucleótidos. (Ver figura 4).

La terminación se produce después de que ambas horquillas de replicación han atravesado la mitad del cromosoma en direcciones opuestas y se encuentran en la región terminal del genoma. En esta región, existen secuencias de ADN que actúan como bloqueadores para el avance de las horquillas, por lo tanto se asegura que la replicación termine en esa pequeña porción del genoma.

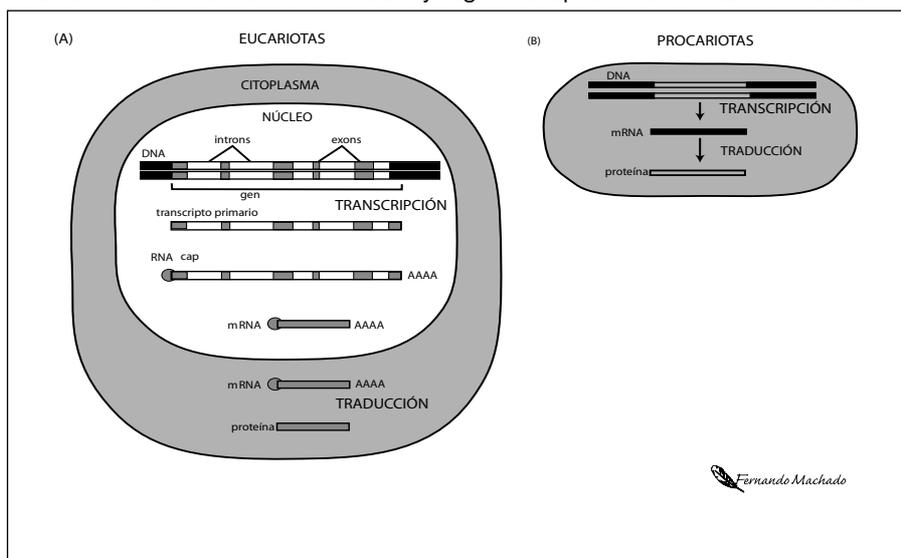
Expresión de los genes procariotas

TRANSCRIPCIÓN Y TRADUCCIÓN

La expresión genética de todas las células depende de los procesos secuenciales de transcripción y traducción que, en conjunto transfieren la información contenida en una secuencia de nucleótidos de un gen, a una secuencia de aminoácidos de una proteína. Esto implica que a partir de la dotación génica portada por la célula (genotipo), se expresarán un conjunto de características evidenciables y que constituirán el fenotipo celular.

Durante la transcripción, las reglas del apareamiento de bases son aplicadas por la ARN

Figura 5. Comparación entre la expresión de los genes eucariotas y procariotas. Los ARNm procariotas son a menudo poligénicos, es decir que contienen información para más de una proteína. El extremo 5' se traduce cuando todavía se está transcribiendo el extremo 3'. Los ARNm eucariotas son monogénicos y requieren de modificaciones postranscripcionales antes de atravesar la membrana nuclear y llegar al citoplasma donde son traducidos.



polimerasa para sintetizar un producto complementario a una cadena del ADN usada como molde, que es el ARN. Una de las clases más importantes de ARN es el llamado mensajero (ARNm), que porta la información para la síntesis de proteínas. La ARN polimerasa bacteriana, es distinta de la que tienen las células eucariotas; de hecho, algunos antibióticos que tienen como sitio blanco de acción la ARN polimerasa (por ejemplo la rifampicina) son efectivos exclusivamente ante células procariotas.

La ARN polimerasa reconoce un sitio específico en el ADN, llamado promotor, al cual se une iniciando la transcripción. Un mismo transcrito, ARNm, puede contener la información correspondiente a más de un gen, por lo tanto se traducirá luego en más de un polipéptido. El conjunto de genes que son transcritos en un único ARNm y que por tanto se expresan en conjunto se denomina operón. (Ver más adelante).

Los genes procariotas no poseen intrones como los eucariotas, es decir que una vez transcrito el ARNm, éste será traducido directamente en una secuencia polipeptídica, sin necesidad de realizar ningún procesamiento después de la transcripción.

Otra diferencia importante con la expresión de los genes eucariotas, es que como las bacterias no tienen un compartimento nuclear definido, los procesos de transcripción y traducción están acoplados. Es decir que mientras se está sintetizando una molécula de ARNm, el ARN naciente puede tomar contacto con los ribosomas e iniciar la síntesis proteica (ver figura 5). Ésto es una ventaja para la bacteria y constituye una importante causa de su elevada capacidad para adaptarse a diferentes ambientes, porque le permite responder rápidamente a los estímulos sintetizando las proteínas necesarias, en el momento adecuado.

La traducción es un proceso por el cual el ARN ribosómico, el ARN de transferencia (ARNt) y muchas proteínas ribosomales, realizan la "lectura" del código genético. Dicho código está "escrito" en tripletes de nucleótidos o codones portados por el ARNm; de la

“escritura” de la secuencia correspondiente de aminoácidos, surge el producto polipeptídico. El ribosoma desempeña un rol fundamental, reuniendo al ARNm y a los ARNt cargados de aminoácidos.

La estructura y composición de los ribosomas procariotas (ARN y proteínas), difiere en cierta medida de los ribosomas eucariotas. Tienen menor masa y por lo tanto, menor coeficiente de sedimentación (la subunidad mayor 50 S y la menor 30 S, ambas suman 70 S). Estas diferencias entre los ribosomas procariotas y eucariotas, igual que otras diferencias en la expresión génica (polimerasas, topoisomerasas, proteínas, mecanismos regulatorios y factores de elongación), tienen una serie de implicancias. Una de éstas es la sensibilidad diferencial de procariotas y eucariotas a toxinas y antibióticos. Por ejemplo los macrólidos, los aminoglucósidos, el cloramfenicol y otros son antibióticos que actúan en el ribosoma bacteriano o en el proceso de síntesis proteica; en cambio, algunas toxinas bacterianas como la diftérica, actúan selectivamente en la síntesis proteica eucariota.

Existen dos sitios en el ribosoma: el aceptor (sitio A), donde los ARNt cargados se asocian en primer lugar y el sitio peptídico (sitio P), donde se sujeta la cadena polipeptídica en crecimiento. En cada adición de aminoácidos, el ARNm avanza un codón y el nuevo aminoácido se traslada del sitio A al P, incorporándose a la proteína en formación.

Como el código genético es universal, el significado de los codones es similar al de los eucariotas, aunque cabe mencionar que existen algunas diferencias en los codones que determinan la iniciación y la terminación de la traducción, así como en la preferencia de uso de ciertos codones.

Como en los procesos de replicación y transcripción, el paso inicial de la traducción es un importante punto de regulación.

Regulación de la expresión génica de las bacterias

Las bacterias tienen muchos mecanismos para controlar la expresión de sus miles de genes, con cual logran que el producto de un gen determinado, solo se sintetice cuando es necesario y, en lo posible en la cantidad óptima. Esto les confiere una importante capacidad de adaptación a cualquier cambio de concentración de nutrientes del medio en que habitan, activándose determinadas vías metabólicas solo cuando son necesario. Así, las bacterias evitan sintetizar enzimas cuando falta el sustrato correspondiente, pero siempre están preparadas para fabricarlas cuando aparece dicho sustrato en el entorno.

Un importante mecanismo de regulación desarrollado por las bacterias, se basa en la activación o desactivación de la transcripción de un grupo de genes cuyos productos tienen funciones relacionadas y que están organizados en una región del genoma que permite regular su expresión. Esta forma de organización genética se denomina operón y le permite a la célula administrar en forma óptima sus reservas energéticas.

Un operón consiste en: un promotor, sitio blanco de la regulación; genes adyacentes que codifican cada una de las enzimas de una vía metabólica y una secuencia de terminación de la transcripción. Así, todos los genes constituyentes de un operón son transcritos de forma coordinada como ARNm policistrónico, es decir multigénico. Dicho ARNm es traducido secuencialmente en proteínas por los ribosomas.

La iniciación de la transcripción puede regularse positiva o negativamente. Los genes bajo control negativo se expresan constantemente, excepto que sean inhibidos por una proteína represora que evitará la expresión del gen por su unión a una secuencia específica del ADN,

denominada operador. Este operador impide que la ARN polimerasa inicie la transcripción en el promotor.

Aquellos genes cuya expresión se encuentra bajo control positivo, no serán transcritos excepto que esté presente una proteína activadora que se une a una secuencia específica del ADN y ayuda a la ARN polimerasa en los pasos iniciales de la transcripción.

Los operones pueden ser inducibles o reprimibles. Se considera inducible, cuando la introducción de un sustrato en el medio aumenta la expresión de las enzimas necesarias para su metabolismo. Éstos solo funcionan en presencia de una pequeña molécula, el inductor. Por otro lado, en el mecanismo de regulación por represión, disminuye la síntesis de algunas enzimas cuando existen cantidades suficientes de los productos terminales de la vía metabólica correspondiente. Esto se denomina represión por producto final; los metabolitos terminales son moléculas llamadas correpresores (ver figura 6).

Un ejemplo clásico es el operón lactosa (*lac*), descrito en *E. coli*. Contiene un conjunto de genes cuyos productos son las enzimas responsables de la degradación de la lactosa. En ausencia de lactosa en el medio, el operón es reprimido por la unión de una proteína represora a la secuencia del operador, esto impide la acción de la ARN polimerasa. La adición de lactosa al medio anula dicha represión, dado que el propio azúcar actúa como inductor uniéndose a

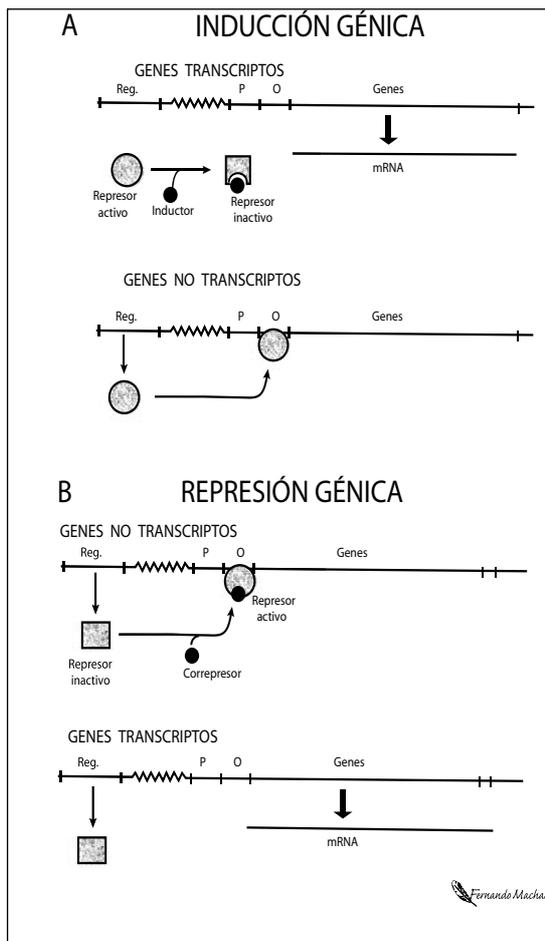


Figura 6. Mecanismos de regulación de la expresión génica.

a) Inducción: Un gen regulador (reg) codifica para una proteína represora en su estado activo que se une al operador (O) bloqueando la unión de la ARN polimerasa al promotor (P). En presencia del inductor, la proteína represora es inactivada y el operador se encuentra disponible para el inicio de la transcripción. b) Represión: El gen regulador codifica para una proteína represora en su estado inactivo. En ausencia de la molécula correpresora, ocurre la transcripción. En presencia del correpresor, la proteína represora es activada para su unión al operador, bloqueando de este modo la transcripción.

la proteína represora e impidiendo que ésta continúe asociada al operador. Este mecanismo de control negativo, asegura que el operón lac se transcriba solo cuando hay lactosa en el medio. Sin embargo, existe un mecanismo para aumentar al máximo la expresión del operón lac, basada en un mecanismo de control positivo mediado por proteínas activadoras. En *E. coli* existe una proteína llamada proteína activadora del gen por el catabolito (PAC), que forma un complejo con el monofosfato de adenosina cíclico (AMPc) y adquiere la capacidad de unirse a una secuencia específica del ADN presente en el promotor. La unión del complejo PAC-AMPc al ADN, potencia la unión de la ARN polimerasa al promotor y permite aumentar la frecuencia de iniciación de la transcripción. Así, no solo se regula la síntesis, sino también la cantidad que se sintetiza, según los requerimientos de las enzimas responsables de la degradación de la lactosa. Este tipo de mecanismo regulador de la transcripción, se encuentra en muchas bacterias para diferentes vías metabólicas.

También existen operones que son regulados en la terminación de la transcripción por un mecanismo especial llamado atenuación que es característico de las vías biosintéticas de aminoácidos y se basa en el acoplamiento entre transcripción y traducción. Este es el caso del operón triptófano (Trp), en el cual el promotor codifica un pequeño péptido que contiene do Trp en posición crítica. Cuando hay suficiente cantidad de este aminoácido en el medio, el péptido se sintetiza rápidamente a partir del promotor que es transcrito y luego traducido. Esto provoca un cambio en la conformación del ADN correspondiente al operón, que permite reconocer una señal de terminación de la transcripción entre el promotor y los genes estructurales; sitio donde la ARN polimerasa se separa del ADN y termina la transcripción. Por el contrario, cuando no hay suficiente Trp, el péptido no podrá sintetizarse y la ARN polimerasa continuará transcribiendo los genes del operón. Así, la célula solo sintetizará el aminoácido, cuando no haya suficiente cantidad de éste en el medio para ser usado en las vías biosintéticas.

No solo en la transcripción existe regulación, también existen en la traducción y luego de ella. La velocidad de la traducción de las diferentes secuencias de ARN transcritos, puede variar más de mil veces según el sitio de unión del ribosoma con el mensajero. Generalmente, el control de la traducción se basa en la obstrucción del sitio de unión del ribosoma, ya sea por la unión de una proteína al ARN ribosómico en ese sitio o por el apareamiento de bases de éste con otro fragmento de ARN. Este es el mecanismo usado para la regulación de la síntesis de las proteínas ribosomales, cuyos genes también se encuentran organizados en operones.

Por último, existe también la regulación postraduccional que la bacteria usa para inactivar enzimas innecesarias. Si bien existen mecanismos para suprimir la producción de enzimas cuando no son necesarias, hay que considerar que estas enzimas tienen una vida media relativamente larga y que en algunas ocasiones es más redituable energéticamente inactivar las enzimas de una vía biosintética, que asumir el gasto de ATP correspondiente al funcionamiento de dicha vía cuando el producto está disponible en el medio.

Mecanismos de variación genotípica

Como vimos, las bacterias tienen mecanismos que les permiten cambiar su expresión génica favoreciendo la síntesis de los productos de ciertos genes y reprimiendo la de otros. Estos mecanismos pueden llamarse de variación fenotípica, ya que implican una serie de cambios en el fenotipo celular o de la población bacteriana. También existen mecanismos de variación genotípica, que serán igualmente traducidos en cambios fenotípicos, pero que se basarán en una modificación de la información genética contenida en la célula.

Básicamente, existen dos formas de variación genotípica en las bacterias. Por un lado, en el genoma se producen cambios debidos a mutaciones y por otro, las bacterias pueden intercambiar material genético y sufrir recombinación.

MUTACIONES

Una mutación es un cambio heredable en la secuencia de bases de los ácidos nucleicos que constituyen el genoma de un organismo; ésta se produce en condiciones naturales con baja frecuencia y se deben fundamentalmente a errores en los procesos de replicación del ADN. Además de las mutaciones espontáneas, pueden ocurrir mutaciones inducidas, provocadas por agentes mutagénicos (químicos, físicos o biológicos) que proporcionan una herramienta para introducir cambios en el genoma bacteriano en el laboratorio. La mayoría de estos errores o alteraciones introducidos en el genoma, son corregidos por los mecanismos de reparación del ADN, pero algunos escapan a la corrección y pueden originar cambios heredables que proporcionan una diversidad genética. Dada la baja frecuencia de mutaciones, solo los microorganismos con alta tasa de crecimiento, pueden alcanzar cifras suficientemente altas como para que sean detectables. Las mutaciones en las bacterias, frecuentemente afectan propiedades fácilmente reconocibles como requerimientos nutricionales, morfología o resistencia antibiótica.

Algunas mutaciones pueden conferir al mutante una ventaja frente a la cepa que le dio origen, bajo ciertas condiciones ambientales, de manera que la progenie de dicha célula mutante es capaz de superar el crecimiento de la cepa original y sustituirla. Este es el caso de las mutaciones que confieren resistencia a los antibióticos, en las que el mutante resistente se seleccionará en un ambiente en el que las bacterias estén expuestas al antibiótico en cuestión. Este tipo de mutaciones se denominan selectivas. En cambio, frente a una mutación no selectiva la bacteria no adquiere beneficios en relación a su progenitor, por ejemplo la pérdida de pigmento de las colonias de *Serratia marcescens* que se observa cuando se cultivan en agar.

Las mutaciones puntuales, son aquellas que implican un cambio en una única base; pueden provocar que se cambie un aminoácido por otro en el producto proteico (mutación por cambio de sentido). Otras veces no se traducen en ningún cambio (mutación silenciosa), dado que como sabemos existe más de un codón para cada aminoácido. También puede suceder que el codón se convierta en una señal de terminación (mutación sin sentido) y en ese caso se traducirá una proteína incompleta no funcional.

Las deleciones y las inserciones producen cambios más notorios en el ADN, provocando la pérdida o la incorporación de cualquier número de pares de bases. Por lo tanto, siempre que éste no sea múltiplo de tres se producirán mutaciones por desplazamiento del marco de lectura, que suele provocar la pérdida total del fenotipo.

Muchas mutaciones que originan un producto proteico defectuoso, pueden ser suprimidas por un segundo evento de mutación en otro sitio del genoma (mutaciones supresoras), restaurándose el fenotipo original.

TRANSFERENCIA DE GENES ENTRE BACTERIAS

La recombinación genética es el proceso mediante el cual los elementos genéticos contenidos en el genoma de diferentes individuos se combina. Esto permite que el individuo origine alguna nueva función que pueda dar como resultado una adaptación a los cambios en el medio ambiente. Este es un evento evolutivo importante y las células tienen mecanismos específicos que aseguran que dicha recombinación se efectúe. A diferencia de los eucariotas donde la recombinación genética ocurre en asociación a la reproducción sexual, en los procariotas

comprende una serie de mecanismos independientes del evento de reproducción celular. Estos mecanismos son llamados transformación, transducción y conjugación.

La transformación es el proceso por el cual ciertas bacterias (llamadas competentes), son capaces de incorporar ADN exógeno proveniente de otras bacterias, que está libre en el medio.

La virulencia del *Streptococcus pneumoniae* está relacionada con la presencia de una cápsula polisacárida a su alrededor. Las bacterias con cápsula tienen un aspecto liso (S) cuando se cultivan en placas de agar y son capaces de matar a los ratones que son inyectados experimentalmente con una suspensión bacteriana. Las colonias con bordes rugosos (R) de *S. pneumoniae*, carecen de cápsula y no son letales al infectar ratones. Frederick Griffith en 1928 observó por primera vez la transformación cuando mezcló bacterias S muertas con bacterias R vivas y encontró que al inyectar la mezcla en ratones, también resultaba letal. De esto concluyó que las cepas R habían sido transformadas en bacterias S, ahora capaces de fabricar el polisacárido capsular virulento.

La capacidad de captar el ADN exógeno, conservarlo en forma estable e interactuar con él, se denomina competencia. Este fenómeno depende de la presencia de un sistema de captación de ADN específico asociado a la membrana. (Ver figura 7). Ejemplos de bacterias con competencia natural son *Haemophilus influenzae*, *Neisseria* sp., *Streptococcus pneumoniae* y ciertas especies de *Bacillus*. Aunque la mayoría de las bacterias no presentan capacidad natural para captar ADN, es posible inducir en el laboratorio la competencia, generando por distintos medios distorsiones en la membrana celular; por ejemplo con pulsos eléctricos (electroporación) o con cambios osmóticos y térmicos. Estos procedimientos son muy usados para introducir experimentalmente ADN extraño, por ejemplo un plásmido, en una bacteria y así transformarla para que adquiera un fenotipo de interés. Las bacterias también pueden ser transformadas con ADN viral, en cuyo caso el proceso se llama transfección.

La transducción es la transferencia de ADN de una bacteria a otra por intermedio de un bacteriófago. Existen dos formas de transducción la especializada y la generalizada. La primera ocurre cuando un fago temperado porta genes bacterianos adquiridos durante un ciclo infeccioso anterior y al infectar una nueva bacteria e integrar su genoma al cromosoma bacteriano, incorporará a éste la información genética correspondiente a la bacteria infectada previamente. La transducción generalizada se produce por partículas virales defectuosas que se originan como cápsides vacías durante la replicación viral y que luego incorporan ADN de una bacteria; así, al infectar una nueva bacteria podrá introducir en ella dicho material genético.

La conjugación se basa en el intercambio unidireccional de información genética desde una bacteria donante a otra receptora mediante un contacto real. (Ver figura 8). Los plásmidos son los elementos genéticos que con mayor frecuencia se transmiten de esta forma. La capacidad de conjugación depende de la presencia en la bacteria de plásmidos conjugativos que contienen los genes necesarios para tal proceso. Un ejemplo muy conocido de plásmido conjugativo es el plásmido F de *E. coli* que codifica las proteínas necesarias para la conjugación, incluyendo el pili sexual. Éste, es una estructura especializada esencial para el contacto entre la bacteria donadora y la receptora. Generalmente, los plásmidos conjugativos solamente causan la transferencia de su propio material genético pero en ocasiones el plásmido puede integrarse al cromosoma bacteriano y en el momento de conjugarse se transferirá no solo a sí mismo, sino también a los genes cromosómicos que se encuentran tras él. Teóricamente todo el cromosoma podría ser transferido lo que requeriría más de dos horas, pero la unión entre las bacterias por medio del pili persiste menos tiempo. Las cepas bacterianas con el plásmido

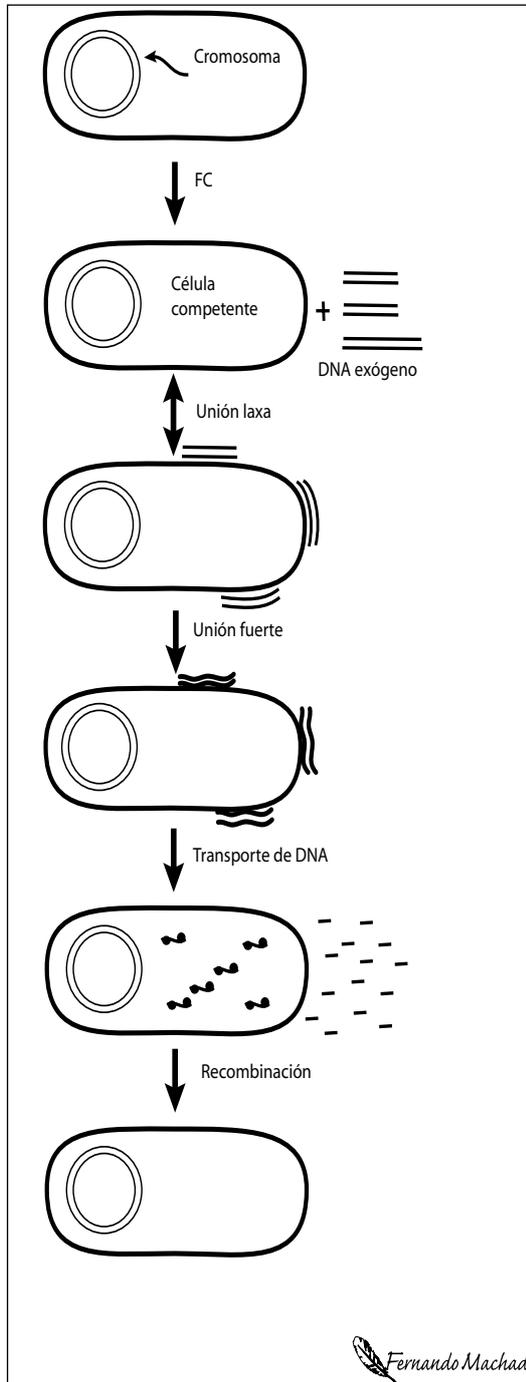
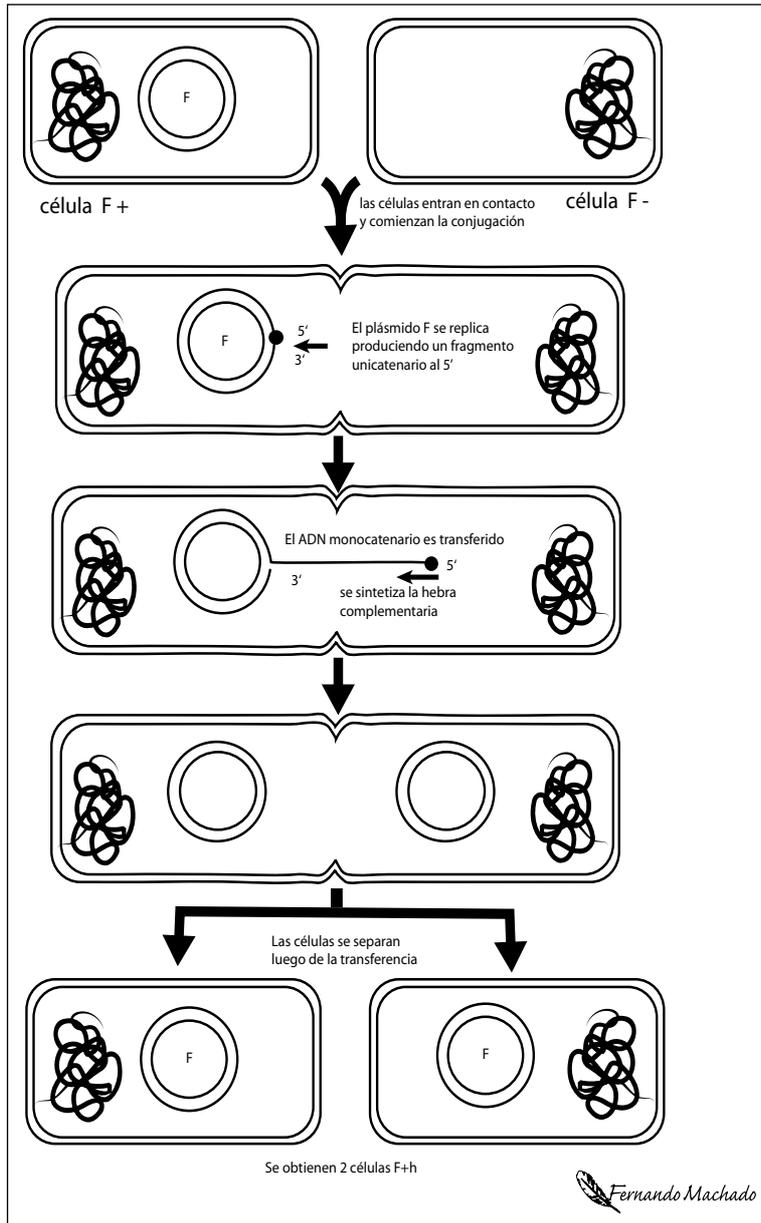


Figura 7. Modelo para el proceso de transformación natural. Para la inducción del estado competente se requiere de un factor de competencia (FC). El DNA exógeno bicatenario se une a las células competentes en dos pasos diferentes, la unión laxa y la fuerte. Fragmentos de DNA monocatenarios son transportados al interior celular unidos a proteínas. Estos complejos DNA-proteínas facilitan la recombinación posterior de los fragmentos exógenos en el cromosoma huésped.

F tienen gran capacidad de recombinación por lo que se denominan cepas hfr por su sigla en inglés (*high frequency of recombination*). Debemos recordar que este es un mecanismo muy efectivo para la transferencia de genes de resistencia antibiótica.

Figura 8. Transferencia del plásmido F mediante conjugación. Una célula F+ es capaz de sintetizar un pili especial (factor F) que le permite iniciar el proceso de conjugación para transferir el plásmido F a una célula receptora F-.



Aportes de la biología molecular y la genética bacteriana a la medicina

Una de las contribuciones más importantes de la ingeniería genética de bacterias, es su uso para desarrollar vectores o vehículos que permitan el clonado de cualquier secuencia de ADN. Los vectores más usados con este fin son los plásmidos bacterianos.

Clonar implica introducir un fragmento de ADN en un vector. Los vectores de clonación deben permitir la inserción de un fragmento de ADN extraño y ser capaces de replicarse normalmente dentro de la bacteria. Como vimos, los plásmidos tienen la capacidad de auto-replicarse y son elementos génicos factibles de ser transferidos entre bacterias e introducidos en una cepa deseada, por lo tanto constituyen buenos vectores de clonación. Actualmente existen varios tipos de vectores, algunos plasmídicos (como el pBR322 o el pUC) y también virales (como el bacteriófago lambda) o, los más modernos llamados cósmidos que combinan algunas de las ventajas de los plásmidos con las de los fagos.

Para clonar un gen cualquiera en un plásmido, es necesario primero cortar el ADN plasmídico y el ADN del cual procede el gen a clonar, para luego ligarlos de la forma deseada. Para esto, se utilizan enzimas de restricción. Muchas bacterias sintetizan estas enzimas, que son capaces de cortar hebras de ADN (extraño a la propia bacteria), en secuencias nucleotídicas específicas. Por ejemplo, una cepa determinada de *E. coli*, produce una enzima denominada EcoRI, que reconoce la secuencia GAATTC y la corta (ver figura 9). Después que EcoRI ha cortado el ADN, quedarán bases sin aparear que estarán disponibles para aparearse con otro fragmento de ADN que tenga las bases complementarias. Si cortamos dos fragmentos de ADN con esta enzima y mezclamos los productos de esa reacción, se obtendrá un producto recombinante por combinación de los dos ADN originales.

Estas enzimas que han sido purificadas hace tiempo y que hoy se producen comercialmente, son usadas para clonar genes en por ejemplo un plásmido bacteriano. De esta manera, es posible incorporar en un plásmido bacteriano un gen eucariota que codifique para una proteína determinada que nos interese producir en grandes cantidades, siempre que se conozca su secuencia nucleotídica y se disponga de enzimas de restricción que sean capaces de cortar específicamente el fragmento que contiene el gen. Una vez obtenido el fragmento de ADN de interés y cortado el plásmido que será usado como vector con las mismas enzimas

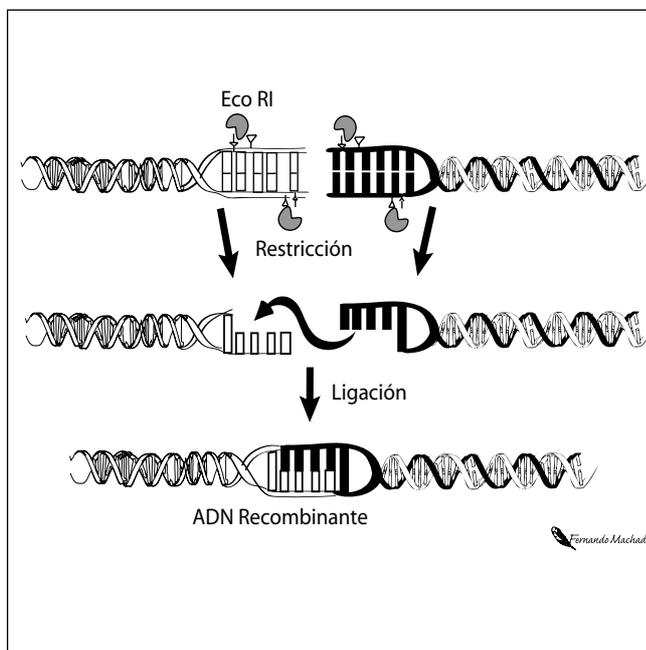


Figura 9. Mecanismo de acción de la endonucleasa EcoRI. La enzima EcoRI reconoce la secuencia GAATTC en el DNA de doble cadena. En ese sitio es capaz de cortar el DNA dejando extremos cohesivos. Esto permite restringir dos moléculas de DNA diferentes y luego ligarlas (utilizando una enzima ligasa), para producir una molécula de DNA recombinante.

de restricción, estaremos en condiciones de ligar ambos fragmentos de ADN, valiéndonos de las propiedades de complementariedad de bases del ADN; así se construye el plásmido recombinante. Este plásmido podrá ser introducido por transformación en una cepa bacteriana apropiada y se podrá producir la proteína de interés en un cultivo bacteriano de *E. coli*, purificándola luego a partir del cultivo (ver figura 10).

Usando estos procedimientos de clonado y expresión de genes, actualmente se producen muchas proteínas que son usadas en el tratamiento de algunas enfermedades humanas (por ejemplo la diabetes), al producir hormonas humanas como la insulina, la hormona de crecimiento o el interferón, en bacterias recombinantes obteniendo cantidades suficientes como para su aislamiento y uso terapéutico.

Además, la disponibilidad de antibióticos naturales para el tratamiento de las infecciones bacterianas no es infinita, por lo que otra importante área de investigación se centra en la aplicación de la ingeniería genética a la creación de nuevos antibióticos. Por manipulación genética se intenta producir mutaciones específicas en los genes encargados de la codificación de proteínas con efecto antibiótico o producir moléculas de antibióticos híbridos, logrados por técnicas de ADN recombinante.

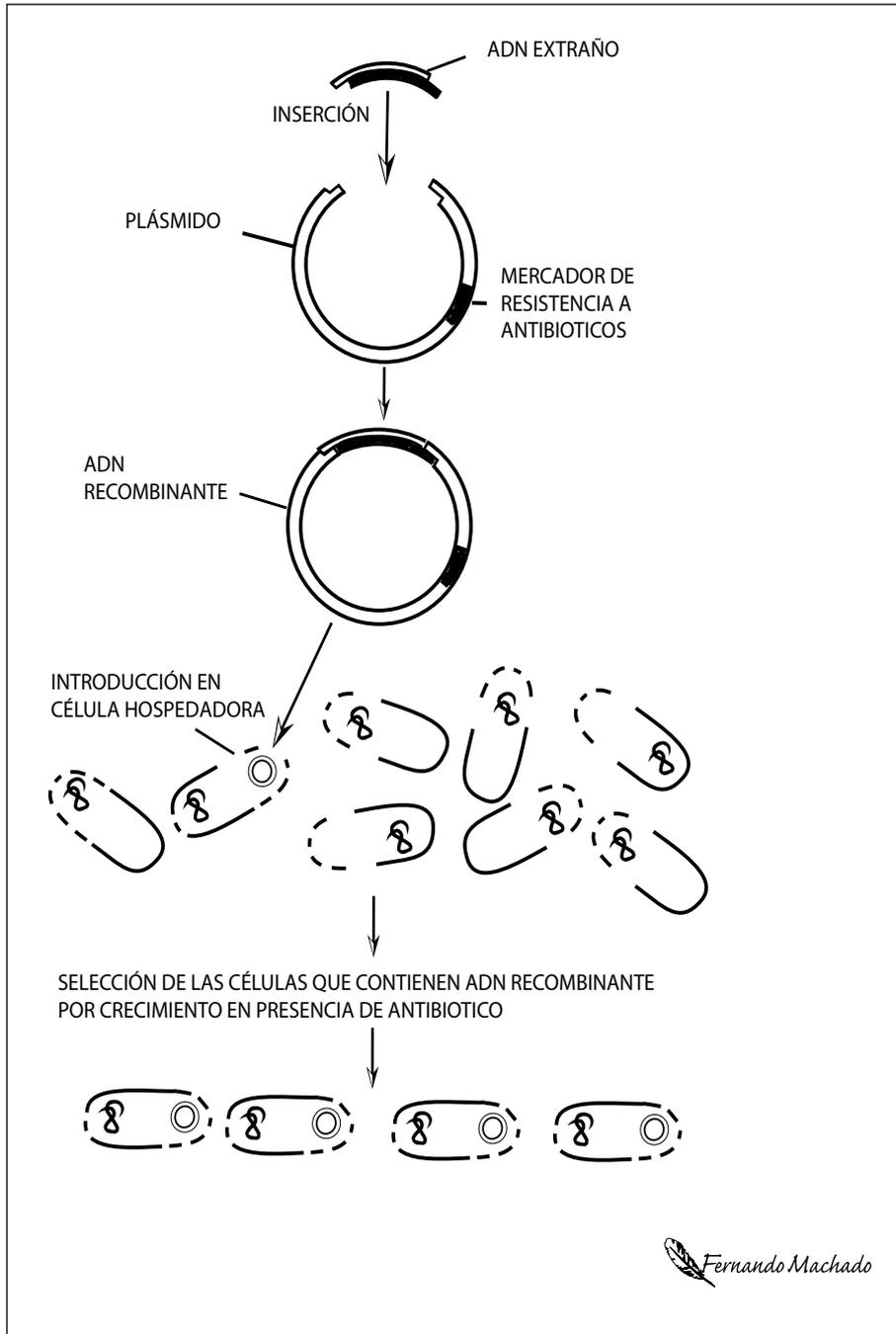
Otra importante aplicación de la biología molecular a la medicina, es la producción de vacunas recombinantes. Este procedimiento se basa en la expresión en bacterias de genes propios de patógenos contra los que se desea vacunar, por ejemplo virus, parásitos u otras bacterias. El procedimiento consiste básicamente en el clonado de genes que codifican para antígenos de superficie del virus o del parásito contra el que se desea vacunar. Estos antígenos serán expresados en la cepa recombinante y purificados a partir del cultivo de la misma cepa, usándose luego como inmunógenos. Así, clonando los genes apropiados en los microorganismos adecuados, podrán producirse grandes cantidades del antígeno puro. Este método proporciona la ventaja de que evita trabajar con microorganismos patógenos. El desarrollo de la vacuna contra la hepatitis B representa el primer éxito de las vacunas recombinantes. Ésta, es producida en una levadura que ha sido transformada previamente con un vector recombinante que contiene el gen del antígeno de superficie del virus.

Estos métodos pueden usarse también para la producción de vacunas vivas, es decir vacunas que son administradas con virus o bacterias vivas que han sido manipuladas genéticamente para perder su virulencia, pero que mantienen intactas sus propiedades inmunogénicas. Además, estos microorganismos denominados atenuados, pueden usarse como vectores de genes de otros gérmenes patógenos para producir vacunas que inmunicen contra más de una enfermedad infecciosa a la vez. Estos procedimientos son motivo de investigación en los laboratorios de desarrollo de vacunas en todo el mundo.

Biotecnología aplicada al diagnóstico clínico

Otro uso de la producción de antígenos a escala industrial en bacterias, es para realizar pruebas diagnósticas que detecten anticuerpos específicos contra antígenos microbianos en el suero de pacientes. En estos casos, interesa clonar en una bacteria de rápido crecimiento como *E. coli*, el gen que codifica para un antígeno determinado del microorganismo contra el cual se desea detectar la respuesta inmune desarrollada por el paciente. De esta manera, se producirá el antígeno proteico en cantidad suficiente como para “capturar” los anticuerpos en la técnica elegida para la prueba diagnóstica, ya sea por ensayo de inmunoadsorción (ELISA), inmunofluorescencia, aglutinación de partículas de látex u otras. Un ejemplo de esto, es el reciente desarrollo de una técnica de ELISA para la detección de anticuerpos dirigidos contra

Figura 10. Clonación de un fragmento de DNA en un plásmido. Un gen de interés puede ser clonado en un plásmido. Para eso, el DNA plasmídico y el DNA exógeno son tratados con la misma enzima de restricción y mezclados en presencia de una enzima ligasa. El producto de la ligación es introducido en una cepa bacteriana por transformación, y se seleccionan los clones recombinantes por la resistencia al antibiótico portada por el plásmido.



el antígeno del core del virus de hepatitis B, habiéndose este antígeno clonado y expresado en *E. coli*.

Las bacterias patógenas se comportan como tales porque poseen ciertos genes, tanto en cromosomas como en plásmidos, que le confieren la capacidad de expresar determinadas características fenotípicas denominadas factores de virulencia o determinantes de patogenicidad. El estudio detallado de la genética bacteriana, ha permitido identificar algunos de estos genes y hoy somos capaces no solo de identificar a una bacteria como patógena cuando la aislamos produciendo enfermedad, sino también cuando encontramos en ella los genes responsables de la expresión de determinantes de patogenicidad. Esto es importante cuando no alcanza con identificar a nivel de especie una cepa bacteriana aislada de una muestra biológica patológica, para afirmar que esa bacteria es el agente causal del proceso infeccioso. Este es el caso de las enfermedades diarreicas causadas por ciertas cepas de *E. coli*. Como sabemos, *E. coli* es parte de la microflora normal del aparato intestinal del hombre y por supuesto esas bacterias no actúan como patógenos en el intestino. Sin embargo, algunas cepas especiales de la misma especie, cuando colonizan el aparato gastrointestinal, a través de la ingesta de alimentos o agua contaminados, son capaces de multiplicarse y causar un proceso infeccioso que se manifiesta con diarrea. Estas cepas productoras de diarrea, difieren en su carga genética de las pertenecientes a la flora normal en que poseen genes que codifican para factores de virulencia, por ejemplo pueden ser capaces de producir toxinas cuyo blanco de acción es el enterocito o producir determinadas proteínas de membrana externa para adherirse a la mucosa intestinal.

Entonces, cuando en una enfermedad diarreica hay que establecer el diagnóstico clínico microbiológico, por ejemplo en un lactante (edad en la que *E. coli* es el primer agente causal de diarrea), no alcanzará con identificar fenotípicamente como *E. coli* a una cepa aislada en el coprocultivo, sino que habrá que determinar la presencia de ciertos determinantes de patogenicidad para afirmar que se trata de una cepa patógena. Una opción para esto es identificar la presencia de los genes que codifican para estos determinantes. Para esto se han desarrollado técnicas de hibridación por sondas, que se basan en las propiedades de complementariedad de bases del ADN. Una sonda, es un fragmento de ADN complementario a una región de un gen que nos interesa identificar, la cual ha sido previamente marcada con algún indicador que pueda ser detectado luego de la hibridación. El marcado puede realizarse incorporando nucleótidos radioactivos o biotinilados o marcados con digoxigenina. Si en un cultivo bacteriano interesa saber si posee el gen X, cuya secuencia es conocida, podremos construir una sonda específica para dicho gen, extraer el ADN del cultivo y mezclarlo con nuestra sonda. Esto se realiza en condiciones que puedan desnaturalizar la estructura de doble cadena de ADN, para permitir que la sonda logre hibridar con su secuencia complementaria. Así, podremos evidenciar si nuestro cultivo posee o no el gen buscado, porque de estar presente encontraremos la marca correspondiente a la sonda incorporada en la estructura del ADN. Esta técnica puede usarse aplicando la sonda directamente sobre una muestra clínica, por ejemplo una sección tisular y en ese caso se denomina hibridación *in situ*.

Hoy se disponen de muchas sondas específicas de ADN usadas para el diagnóstico de muchas enfermedades bacterianas. La hibridación por sondas y otros métodos para detectar un gen en particular, es útil para realizar el diagnóstico etiológico de las infecciones producidas por microorganismos cuyo cultivo es dificultoso, ya sea por crecimiento lento como en *Mycobacterium* sp., o por tener requerimientos especiales de cultivo y aislamiento como *Chlamydia* sp., *Rickettsia* sp. o virus.

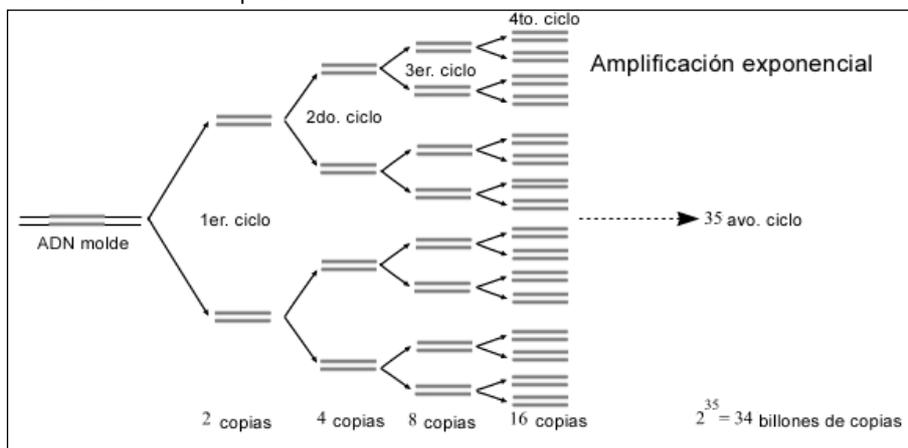
El mayor problema diagnóstico usando hibridación por sondas, es la baja sensibilidad de

la técnica, dado que es necesario que en la muestra existan suficientes copias del gen buscado como para que la marca correspondiente a la sonda sea detectada. Generalmente, las técnicas de hibridación *in situ* con sondas no radioactivas, son capaces de detectar más de 200 copias del gen. Por esto, muchas veces la sensibilidad de la técnica no es suficiente como para descartar aquellas muestras en las que se obtienen resultados negativos.

Uno de los más interesantes avances en diagnóstico clínico, ha sido el desarrollo de un método que permite amplificar el número de copias de un determinado fragmento de ADN de interés. Esta técnica, llamada reacción en cadena de la polimerasa (PCR), permite generar millones de copias exactas de un fragmento de ADN a partir de una copia original en dos o tres horas. La PCR se basa en las propiedades de replicación del ADN la cual puede reproducirse *in vitro* si se coloca el ADN molde en una mezcla de ADN polimerasa, nucleótidos y cebadores específicos (primers) para las regiones del fragmento que se desea amplificar. Esta mezcla, se coloca en condiciones de pH y osmolaridad tales que permitan el funcionamiento adecuado de la polimerasa. Primero se coloca la mezcla a altas temperaturas (94 o 95°C) para lograr que el ADN se desnaturalice, es decir que se separen ambas hebras. Luego se somete a temperaturas adecuadas para que los cebadores hibriden con el ADN molde (entre 40 y 55°C, según la secuencia de los cebadores). En una tercera etapa, se coloca a la temperatura adecuada para que la polimerasa de ADN actúe catalizando la replicación. Las polimerasas que se usan para estos fines, deben ser capaces de tolerar las altas temperaturas de desnaturalización del ADN, por lo que la enzima utilizada proviene de una bacteria termófila. La polimerasa más usada en PCR, proviene de *Thermus aquaticus* (Taq polimerasa) cuya temperatura óptima es 72°C. Hoy se usa ésta y también otras enzimas, producidas en forma recombinante en *E. coli*.

Estos cambios de temperatura se realizan en un termociclador, que es capaz de variar entre rangos muy amplios de temperatura en tiempos muy cortos. Este ciclado de temperaturas, por ejemplo: 94°C por un minuto, 45°C por un minuto y 72°C por un minuto y medio, se repite aproximadamente 30 veces. Así, se logra que en cada ciclo se duplique el número de

Figura 11. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El ADN molde se desnaturaliza (aprox. 94 °) y los primers se unen en sus secuencias complementarias en los extremos de la región a amplificar (aprox. 55°, según la secuencia de los primers). Luego la polimerasa sintetiza una nueva hebra de ADN a partir de cada primer copiando la cadena molde (a 72°). Así se completa un ciclo, repitiéndose el proceso unas 35 veces, amplificando la secuencia de interés en forma exponencial.



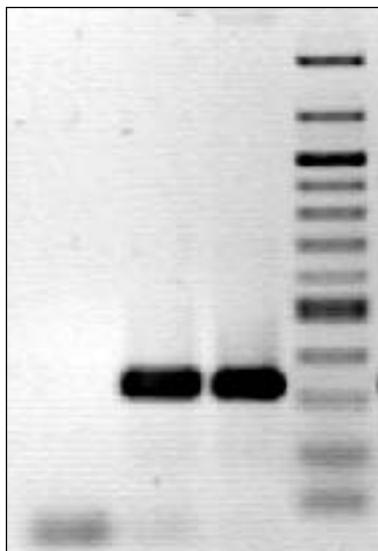


Figura 12. Corrida electroforética en gel de agarosa, para revelar una reacción de PCR. En el carril de la derecha se observa un marcador de peso molecular y en los dos carriles anteriores el producto de la amplificación del tamaño esperado. En el primer carril la muestra no contenía la secuencia de interés.

copias de cada una de las hebras del ADN molde, con lo que se logra un crecimiento exponencial (ver figura 11).

Este procedimiento puede aplicarse directamente a una muestra clínica, para determinar la presencia o ausencia de un microorganismo en particular, mediante la detección de una secuencia específica en su ácido nucleico.

Para revelar el resultado del ensayo, la mezcla de reacción debe ser sometida a electroforesis en gel de agarosa o de poliacrilamida. En esta, el ADN migra desde el polo negativo al positivo en diferentes grados según el peso molecular, es decir su tamaño en pares de bases. El fragmento a amplificar es por supuesto de tamaño conocido, por lo que podrá determinarse la presencia del gen buscado en la muestra, porque se habrá amplificado en la reacción y aparecerá una banda del tamaño correspondiente en el gel (ver figura 12).

Los geles deberán ser revelados para que desarrollen una reacción de color visible que nos ayude a determinar la presencia o ausencia de la banda de interés. En los geles de agarosa, el revelado se hace generalmente con bromuro de etidio, que es un agente intercalante del ADN, es decir que su molécula se intercala entre las bases del ácido nucleico. Este

procedimiento colorea el gel porque el bromuro de etidio fluoresce bajo luz ultravioleta; por lo tanto cuando el gel se expone a la luz ultravioleta, se evidenciará o no la banda correspondiente. En los geles de poliacrilamida, el revelado puede realizarse con nitrato de plata.

El resultado de la PCR también puede evidenciarse, combinado la PCR con una técnica de hibridación por sondas. Esto se logra transfiriendo el ADN del gel a una membrana (por ejemplo de nitrocelulosa) y ponerla en contacto con una sonda específica. En este caso el revelado lo brinda la marca de la sonda. Este procedimiento de transferencia de ADN a una membrana combinado con hibridación por sondas, se denomina Southern Blott.

Aunque hemos centrado el interés de estas técnicas de detección de ácidos nucleicos para el diagnóstico de las enfermedades infecciosas, también son usadas para diagnosticar algunas enfermedades neoplásicas y hereditarias.

La aplicación de la biotecnología molecular a la medicina, representa un campo de intensa investigación y vertiginoso desarrollo. La prevención, el tratamiento y el diagnóstico de muchas enfermedades que hasta hace pocos años resultaba imposible, hoy son una realidad y cada vez la biología molecular aporta más conocimientos y tecnología aplicables a la mejora de la calidad de vida y la salud humana.

Bibliografía

- Schaechter M, Medoff G, Eisenstein BI, Guerra H. Microbiología. Mecanismos de las enfermedades infecciosas. Ed Panamericana. 2ª ed. Buenos Aires 1993

- Joklik WK, Willett HP, Amos DB, Wilgert CM. editores, Zinsser Microbiología. 20ª ed. BsAs. Panamericana; 1994.
- Lewin B. Genes VII. Ed. Reverté, 7 ed. 2000.
- Murray PR. Baron EJ. Jorgensen JH. Pfaller MA. Tenover FC. Tenover FC. Editors. Manual of Clinical Microbiology. 8ª ed. Washington, D.C. ASM Press. 2003.
- Watson JD, Tooze J, Kurtz DT. ADN recombinante. Introducción a la ingeniería genética. Ed. Labor. 1988.