



de esa 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 4.200 kilobases (Kb).

Como sabemos, 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 1.000 veces la longitud de la célula. Las bacterias, no poseen histonas asociadas a su genoma y por tanto no tienen la posibilidad de compactar su ADN en estructuras tipo nucleosomas como las células eucariotas. Por lo tanto, deben solucionar el dilema de como compactar su cromosoma de otra manera. Esto se logra, porque el ADN circular cerrado es capaz de adoptar una estructura terciaria denominada de “**superenrollamiento**”, que implica el enrollamiento del eje de la doble hélice sobre si mismo. (Fig. 2)

Este superenrollamiento se dice que tiene sentido negativo, porque es en el sentido contrario al del enrollamiento de una hebra de ADN sobre la otra, y supone para la bacteria una fuente de almacenamiento de energía para ser utilizada en una variedad de procesos fisiológicos que la requieren, como por ejemplo la separación de las 2 hebras de ADN necesaria para la replicación y la transcripción.

El cromosoma bacteriano, es suficientemente largo como para formar varios lazos circulares, que como tales pueden a su vez superenrollarse, formando de esta manera una serie de dominios topológicos independientes. Esta organización en dominios, colabora al estado de compactación general del genoma bacteriano, e impide que con la ruptura de una hebra en un punto cualquiera del cromosoma, se pierda el total del superenrollamiento, manteniendo de esta forma la energía almacenada.

Las bacterias poseen enzimas capaces de alterar la estructura del ADN modificando su superenrollamiento. Estas enzimas que se denominan genéricamente “**topoisomerasas**”, actúan introduciendo o eliminando vueltas “superhelicoidales”, cumpliendo un importante rol en los procesos de replicación y transcripción del ADN. Por otra parte, es interesante mencionar que algunas de estas topoisomerasas, como la ADN girasa, son blanco de acción para los antibióticos del grupo de las quinolonas, como el ácido nalidíxico.

### LOS PLASMIDOS SON ADN EXTRACROMOSOMICO

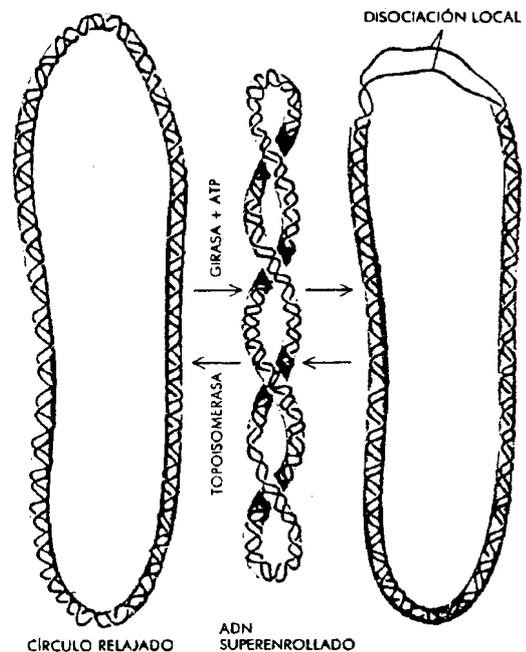
Como ya dijimos, muchas bacterias poseen información génica contenida en moléculas de ADN distintas a las del cromosoma bacteriano,

denominadas **plásmidos**. Los plásmidos, son moléculas circulares de ADN de doble cadena que constituyen una unidad de replicación independiente del cromosoma. Por esto pueden 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 mas pequeños pueden estar en hasta 100 copias por célula (plásmidos multicopia).

Si bien el ADN plasmídico no porta información genética esencial para la vida de la bacteria, sí portan genes que le confieren nuevas propiedades fenotípicas y que en algunos casos le son muy útiles para su adaptación al crecimiento en ciertos ambientes.

Muchas bacterias potencialmente patógenas para el hombre, solo son capaces de comportarse como tales, cuando portan un plásmido en particular que contiene genes que le permiten expresar moléculas de adhesión a los tejidos del huésped o sintetizar sustancias tóxicas para éste. Como ejemplo, podemos mencionar el caso de la producción de la toxina tetánica, por *Clostridium tetani*, agente causal del tétanos.

En muchos casos, los plásmidos contienen genes que codifican para enzimas capaces de degradar algunos antibióticos, permitiendo que la bacteria sobreviva a la acción de los mismos. Este es el caso de la producción de beta lactamasas por



**Figura 2.** Una molécula de ADN circular relajado puede ser retorcida por una girasa para formar una molécula superenrollada negativamente. La reacción inversa es catalizada por una topoisomerasa. La disociación local de las cadenas puede relajar la tensión de la molécula superenrollada.

cepas *Neisseria gonorrhoeae*, *Staphylococcus aureus* o *Haemophilus influenzae*, que poseen un plásmido que les confiere resistencia a ciertos antibióticos beta lactámicos como Penicilina y Ampicilina.

Los plásmidos pueden clasificarse según distintos criterios, por ejemplo por su tamaño en pb, su número de copias en la bacteria o por el tipo de genes que porta (plásmidos de virulencia, plásmidos de resistencia a antibióticos, etc.) También pueden clasificarse en **grupos de incompatibilidad**. Se dice que dos plásmidos pertenecen al mismo grupo de incompatibilidad si son incapaces de coexistir en la misma célula bacteriana. 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 mas adelante). Estos plásmidos de conjugación codifican todos los factores necesarios para su transferencia. Algunos plásmidos mas pequeños, no conjugativos, pueden ser movilizados es decir que poseen la secuencia necesaria para permitir su transferencia, pero no codifican por ellos mismos las proteínas necesarias para ser transferidos. Por último, algunos 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, transducción mediada por fagos o incorporación en el cromosoma, según veremos mas adelante.

### **LAS BACTERIAS PUEDEN TENER GENES “SALTARINES”**

Los **elementos transponibles**, son segmentos de ADN capaces de moverse desde una posición a otra en el genoma, es decir “transponerse” o “saltar” desde un sitio determinado del genoma, escindiéndose del resto del ADN, hasta otro sitio distinto, integrándose. Pueden saltar del cromosoma a un plásmido y viceversa o a distintos sitios dentro de la misma molécula de ADN.

Los elementos transponibles están ampliamente distribuidos en la naturaleza, tanto en virus, células procariotas y eucariotas.

Existen 2 variedades de elementos transponibles:

1) Las **secuencias de inserción** (elementos IS)

2) Los **transposones** (Tn)

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

Los **Tn** son segmentos de ADN que además de portar la información necesaria para la transposición, contienen genes extra, que pueden codificar para muy distintas propiedades fenotípicas, encontrándose entre las mas importantes desde el punto de vista clínico, la resistencia a antimicrobianos como ser el caso de la resistencia de alto nivel a la gentamicina encontrada en algunas cepas de

*Enterococcus sp.*

Algunos plásmidos, poseen uno o mas Tn que portan determinantes de resistencia a antibióticos, y la capacidad de estos elementos para saltar de un plásmido a otro, proporciona a las bacterias una gran flexibilidad para desarrollar resistencia, debido a que estos plásmidos son en general conjugativos, por lo que pueden transferirse entre distintas bacterias.

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

### **REPLICACION DEL ADN BACTERIANO**

El genoma completo de una célula, tanto sea procariota como eucariota, debe replicarse con exactitud una vez por cada división celular. Por 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.

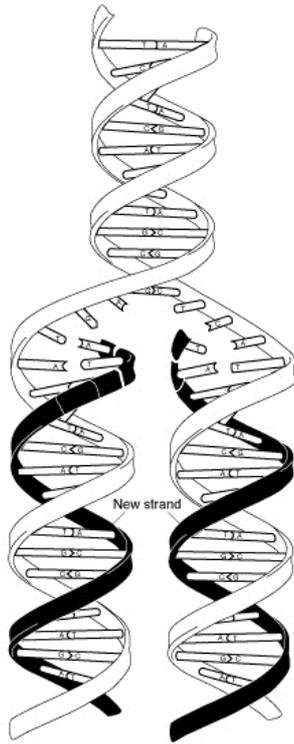


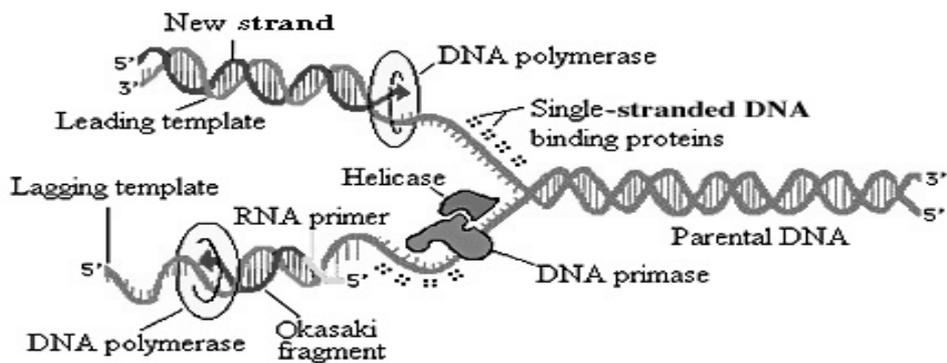
Fig. 3. La replicación semiconservativa del ADN genera dos moléculas idénticas.

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 el cual contiene todos los

elementos requeridos para regular este proceso. El cromosoma bacteriano, se replica a partir de un único origen, que se mueve de forma lineal hasta completar la duplicación total de la molécula, por lo que constituye un replicón. Esto facilita su regulación, que está centrada en la etapa de iniciación, una vez que la replicación del cromosoma se inicia en el origen, todo el cromosoma será duplicado. Los plásmidos, constituyen replicones independientes del cromosoma, dando lugar a una replicación por ciclo celular coordinada con la replicación genómica (plásmidos unicopia) o puede permitir varias replicaciones por ciclo (plásmidos multicopia).

El punto en el que el ADN 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 rápidamente, que si el proceso fuera unidireccional, pudiendo replicar más de 1000 pb por segundo. Es de destacar que a pesar de



### Collaboration of Proteins at the Replication Fork

Fig. 4. Para la replicación del ADN hacen falta varias enzimas. 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 uncatenario 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.

tal velocidad de replicación, la fidelidad de la misma es muy grande, siendo la frecuencia de mutaciones espontáneas del orden de 1 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" lo cual resalta la importancia de la complementariedad de bases en la estructura del ADN (Fig. 3).

Las enzimas encargadas de catalizar el proceso de replicación, se denominan **ADN polimerasas**. En *E. coli* se conocen 3 ADN polimerasas distintas. La responsable de la mayor parte de los procesos de replicación es la llamada polimerasa III, mientras que las polimerasas I y II cumplen fundamentalmente roles en la reparación de rupturas o de errores en las moléculas de ADN.

También participan otras enzimas, como son las llamadas **helicosas**, responsables de "desenrollar" el ADN en el origen o cerca de él, paso que resulta indispensable para iniciar la replicación.

Esquemáticamente, podemos decir que la replicación consta de 3 fases: iniciación, elongación y terminación.

La **iniciación**, se da a partir del origen de la replicación donde se forma la o las horquillas de replicación, por la acción de **helicosas** que "desenrollan" la estructura del ADN,

formándose así una porción monocatenaria que estará en condiciones de formar un complejo con ciertas 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", sobre el que la ADN polimerasa agrega los nucleótidos.

La **elongación**, consiste en el avance de la horquilla de replicación, conforme se van agregando nucleótidos a la cadena neosintetizada, en un orden establecido por las reglas de complementariedad de bases (A con T y C con G) entre la cadena "molde" y la nueva cadena en síntesis. 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 de una cadena de ADN molde, un cebador y por supuesto los nucleótidos. (Fig. 4)

La **terminación** se da luego 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 hay secuencias de ADN que actúan como bloqueadores para el avance de las horquillas, por lo que se asegura que toda replicación termine en esa pequeña porción del

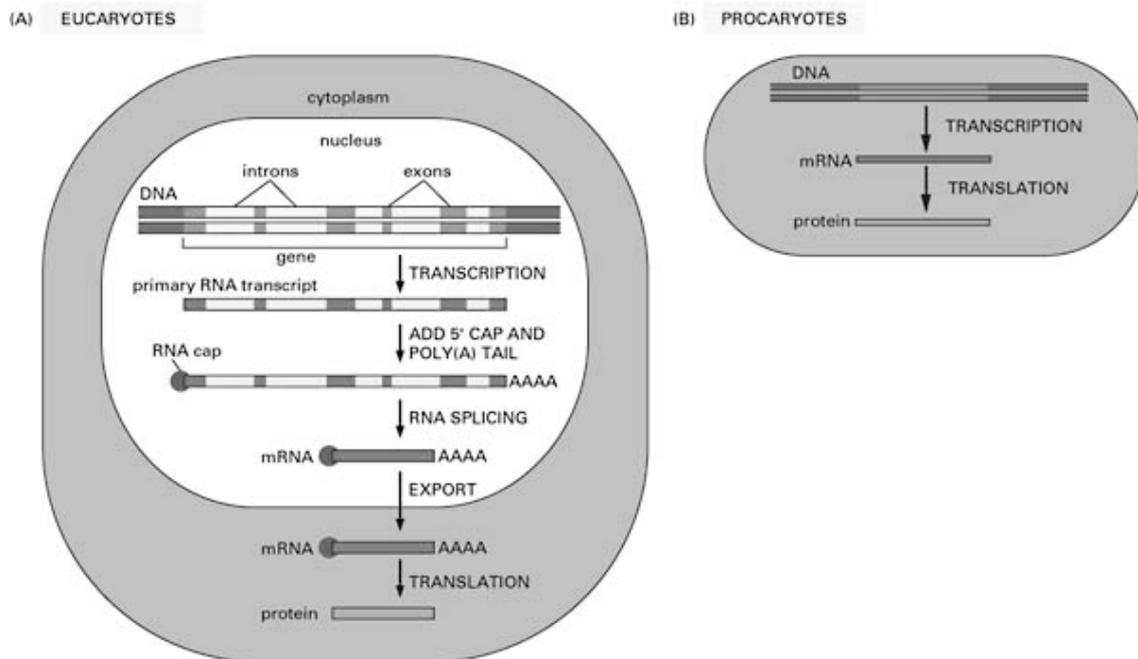


Fig. 5. Comparación entre la expresión de los genes eucariotas y procariotas. Los ARNm procariotas son a menudo poligénicos, es decir que contienen información para mas de una proteína. El extremo 5' se traduce cuando todavía se está transcribiendo el extremo 3'. Los ARNm eucariotas son monogénicos y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

genoma.

## LA EXPRESIÓN DE LOS GENES PROCARIOTAS: TRANSCRIPCIÓN Y TRADUCCIÓN.

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

Durante la transcripción, las reglas del apareamiento de bases son usadas por la **ARN polimerasa** para sintetizar un producto complementario a una cadena del ADN usado como molde, que constituye el ARN. Una de las clases más importantes de ARN es el llamado **mensajero**, que lleva la información para la síntesis de proteínas. La ARN polimerasa bacteriana, es distinta de la de las células eucariotas, y de hecho, ciertos antibióticos que tienen como blanco la ARN polimerasa (como la rifampicina) son efectivos exclusivamente frente a células procariotas.

La ARN polimerasa, reconoce un sitio específico en el ADN, llamado **promotor**, al cual se une, iniciando el proceso transcripcional. Un mismo transcrito, ARNm, puede contener la información correspondiente a más de un gen, por lo que 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 un procesamiento post-transcripcional.

Otra importante diferencia con la expresión de los genes eucariotas, es que por no poseer las bacterias un compartimento nuclear definido, los procesos de transcripción y traducción, se encuentran 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. (Fig. 5) Esto implica una ventaja para la célula bacteriana, y constituye una importante causa de su gran capacidad de adaptación a diferentes ambientes, ya que le permite responder rápidamente a los estímulos sintetizando los productos proteicos necesarios en el momento adecuado.

La traducción es un proceso por el cual el ARN ribosómico, el ARN de transferencia (ARNt) y numerosas proteínas ribosomales y otras, participan en la "lectura" del código genético dado por los tripletes de nucleótidos o **codones** portados por el ARNm, y en la "escritura" de la secuencia correspondiente de aminoácidos en el producto polipeptídico. El ribosoma desempeña un papel fundamental, reuniendo al ARNm y a los ARNt cargados de aminoácidos.

La estructura y composición en ARN y proteínas de los ribosomas procariotas, difiere en cierta medida de la de los ribosomas eucariotas. Tienen una menor masa y por tanto un coeficiente de sedimentación menor (50 S la subunidad mayor y 30 S la menor, haciendo en conjunto 70 S) Estas diferencias entre los ribosomas procariotas y eucariotas, del mismo modo que otras diferencias en la expresión del material genético (polimerasas, topoisomerasas, proteínas y mecanismos regulatorios, factores de elongación) tienen una serie de implicancias. Una de éstas es la sensibilidad diferencial de procariotas y eucariotas a sustancias como toxinas y antibióticos. Por ejemplo macrólidos, aminoglucósidos, cloramfenicol y otros son antimicrobianos que actúan sobre el ribosoma bacteriano o el proceso de síntesis proteica, mientras que ciertas toxinas bacterianas como la diftérica, actúan selectivamente a nivel de la síntesis proteica eucariota.

Existen 2 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. Durante cada paso de adición de aminoácidos, el ARNm avanza 1 codón y el nuevo aminoácido se traslada del sitio A al sitio P, incorporándose a la proteína en formación.

Como el código genético es universal, el significado de los codones es muy similar al de los eucariotas, aunque cabe mencionar que se encuentran 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.

## LA REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GENÉTICA EN BACTERIAS

Las bacterias tienen una gran variedad de 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 permite una sorprendente capacidad de adaptación a cualquier cambio en

la concentración de nutrientes del medio en que habitan, activando solo cuando es necesario, determinadas vías metabólicas. Así, las bacterias evitan sintetizar enzimas cuando falta el sustrato correspondiente, pero siempre están preparadas para fabricarlas cuando aparece el sustrato en el entorno.

Un importante mecanismo regulatorio desarrollado por las bacterias se basa en la activación o desactivación de la transcripción de un grupo de genes cuyos productos tienen funciones relacionadas, que se encuentran organizados en una región del genoma de forma de regular su expresión en conjunto. 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** que es el blanco de la regulación; genes adyacentes que codifican cada uno de las enzimas de una vía metabólica y una secuencia de terminación de la transcripción.

De esta manera, todos los genes constituyentes de un operón, son transcritos de manera coordinada, como **ARNm policistrónico**, es decir, multigénico, que es traducido secuencialmente en proteínas por los ribosomas. La iniciación de la transcripción puede regularse de forma positiva o negativa. Los genes bajo **control negativo** se expresan constantemente a menos que sean "desconectados" por una **proteína represora** que evitará la expresión del gen mediante su unión a una secuencia específica del ADN denominada **operador**, impidiendo que la ARN polimerasa inicie la transcripción en el promotor.

Aquellos genes cuya expresión se encuentra bajo **control positivo**, no serán transcritos a menos que esté presente una **proteína activadora** la cual 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 que los operones son inducibles cuando la introducción de un sustrato en el medio aumenta la expresión de las enzimas necesarias para su metabolismo. Esos operones inducibles sólo funcionan en presencia de una pequeña molécula llamada **inductor**.

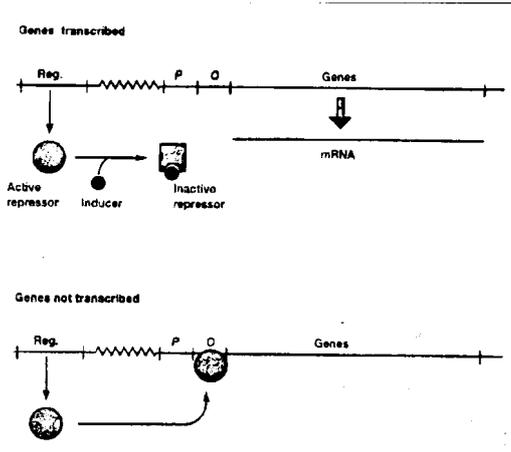
Por otro lado, un mecanismo regulatorio por represión, es el caso de algunas enzimas cuya síntesis disminuye cuando se encuentran cantidades suficientes de los productos terminales de la vía metabólica correspondiente. Esto se denomina "represión por producto final" y en este caso los metabolitos terminales son moléculas conocidas como **correpresores**.

Un ejemplo clásico es el del operón lactosa (*lac*), descrito en *E. coli*. (Fig. ) Este operón, contiene un conjunto de genes cuyos productos son las enzimas responsables de la degradación del azúcar lactosa. En ausencia de lactosa en el medio, el operón es reprimido por la unión de una proteína represora a la secuencia del operador, lo que impide la función de la ARN polimerasa. La adición de lactosa anula esta represión, ya que el propio azúcar actúa como inductor, uniéndose a la proteína represora, impidiendo que ésta continúe asociada al operador. Este mecanismo de control negativo, asegura que el operón *lac* se transcriba solo cuando se encuentra lactosa en el medio.

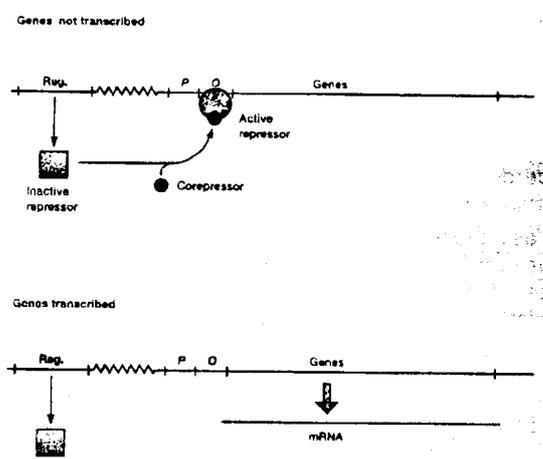
Por otra parte, existe un mecanismo para aumentar al máximo la expresión del operón *lac*, basada en un mecanismo de control positivo, mediado por proteínas activadoras. En el caso de *E. coli*, una proteína llamada **proteína activadora del gen** por el **catabolito (PAC)**, forma un complejo con AMPc 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, permitiendo así un aumento en la frecuencia de iniciación de la transcripción. De esta manera, se regula no solo la síntesis sino también la cantidad que se sintetiza, según los requerimientos, de las enzimas responsables de la degradación de la lactosa.

Este mismo tipo de mecanismos reguladores de la transcripción, se encuentran en muchas bacterias para una gran variedad de vías metabólicas.

Por otra parte, también existen operones que son regulados a nivel de la terminación de la transcripción, por un mecanismo especial llamado **atenuación**, que es característico de las vías biosintéticas de aminoácidos y está basada en la característica de acoplamiento entre transcripción y traducción. Este es el caso del operón triptofano, en el que el promotor codifica para un pequeño péptido que contiene 2 Trp en una posición crítica. Cuando hay suficiente cantidad del aminoácido en el medio, el péptido se sintetiza rápidamente a partir del promotor que es transcrito y luego traducido. Esto conduce a un cambio conformacional en el ADN correspondiente al operón, que permite que se reconozca una señal de terminación de la transcripción, entre el promotor y los genes estructurales, en donde la ARN polimerasa se separa del ADN y termina la transcripción. Por el contrario, cuando no se encuentra suficiente Trp, el péptido no podrá sintetizarse y la ARN polimerasa continuará transcribiendo el



**Figura 6. Inducción génica.** El gen regulador Reg, sintetiza un represor activo, que se une al operador O, y bloquea la unión de la ARN polimerasa al promotor P, a menos que el inductor lo inactiva. En presencia del inductor, la proteína represora es inactivada, y ocurre la transcripción.



**Represión génica.** El gen regulador Reg, sintetiza una proteína represora inactiva, que debe ser activada por la unión del corepresor, antes de poder unirse al operador O, y bloquear la transcripción. En ausencia del corepresor el represor es inactivado y ocurre la transcripción.

conjunto de los genes del operón. De esta manera, la célula solo sintetizará el aminoácido, cuando no haya suficiente cantidad en el medio como para utilizarlo para sus necesidades biosintéticas.

No solo a nivel de la transcripción existe regulación, sino que también existen mecanismos reguladores que actúan a nivel de la traducción y aún luego de la misma. La velocidad de la traducción de las diferentes secuencias de ARN transcripts, puede variar mas de 1000 veces, según el sitio de unión del ribosoma con el mensajero. En general, 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 del mismo con otro fragmento de ARN. Este es el mecanismo utilizado para la regulación de la síntesis de las proteínas ribosomales, cuyos genes también se encuentran organizados en operones.

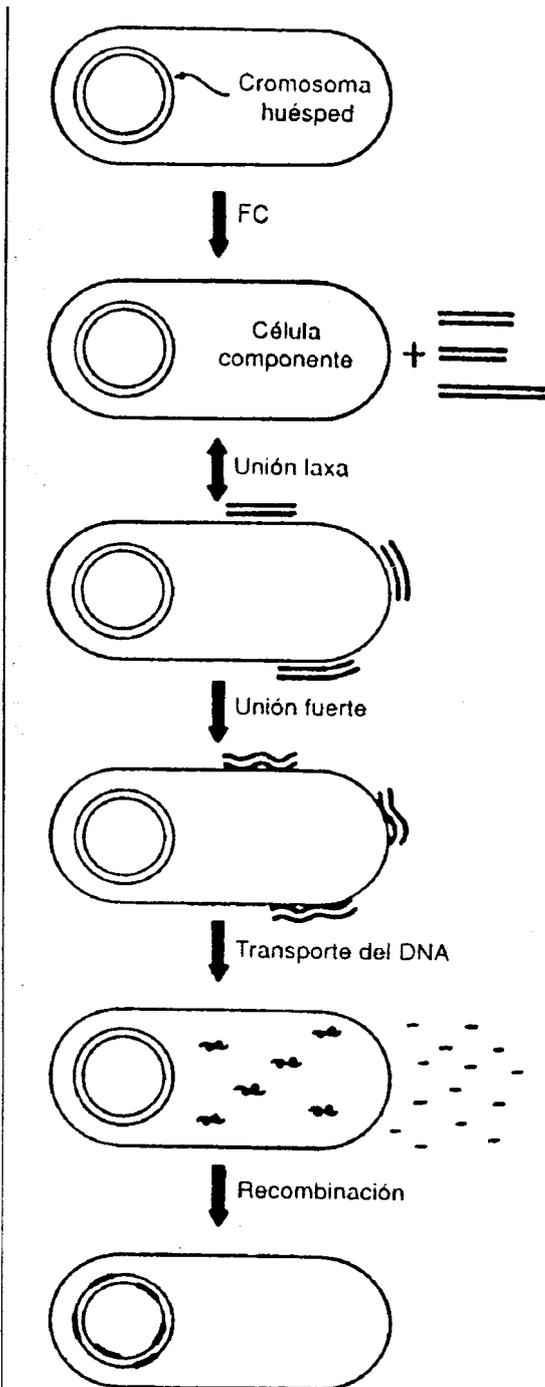
Por último, existe también una regulación postraduccional, que le es útil a la célula bacteriana para inactivar enzimas innecesarias, ya que hay que considerar que si bien tienen mecanismos para dejar de producir enzimas cuando no las requieren, éstas tienen una vida media relativamente larga, y en ciertas ocasiones le es más redituable desde el punto de vista energético inactivar las enzimas de una ruta biosintética, que asumir el gasto de ATP correspondiente al funcionamiento de la ruta, cuando el producto se encuentra disponible en el medio.

### VARIACION GENOTÍPICA: MUTACIONES Y TRANSFERENCIA DE GENES

Como vimos, las bacterias tienen mecanismos que les permiten variar su expresión génica favoreciendo la síntesis de los productos de ciertos genes y reprimiendo las 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. A su vez, también tienen mecanismos de **variación genotípica**, que serán igualmente traducidos en cambios fenotípicos, pero que se basan en una modificación de la información genética contenida en la célula.

Básicamente, existen 2 formas de variación genotípica en bacterias. Por un lado, el genoma está sujeto a sufrir cambios debidos a mutaciones y por otro lado, las células bacterianas pueden intercambiar material genético y de esa forma sufrir recombinación.

Una **mutación** es un cambio heredable en la secuencia de bases de los ácidos nucleicos que constituyen el genoma de un organismo, que ocurren en condiciones naturales con una muy baja frecuencia y se deben fundamentalmente a errores en los procesos de replicación del ADN. Además de las mutaciones **espontáneas**, pueden ocurrir también mutaciones **inducidas**, provocadas por agentes mutagénicos que pueden ser químicos, físicos o biológicos los cuales 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 dar lugar a cambios heredables que proporcionan una diversidad genética. Dada la



**Figura 7.** Modelo para la transformación de Streptococcus. Para la inducción del estado competente se requiere el factor de competencia (FC). El DNA bicatenario se une a las células competentes al menos en dos pasos diferentes, conocidos como de unión laxa y fuerte. El transporte de fragmentos monocatenarios da lugar a la formación de complejos DNA-proteína y a la recombinación ulterior de los fragmentos en el cromosoma huésped.

baja frecuencia de mutaciones, solo los microorganismos, con su alta tasa de crecimiento, pueden alcanzar las cifras suficientemente altas como para que sean detectables. Las mutaciones en bacterias, frecuentemente afectan propiedades fácilmente

reconocibles como requerimientos nutricionales, morfología o resistencia a antibióticos.

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 natural 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, como por ej. la pérdida de pigmento de las colonias de *Serratia marcescens* que se observa al ser cultivadas en agar.

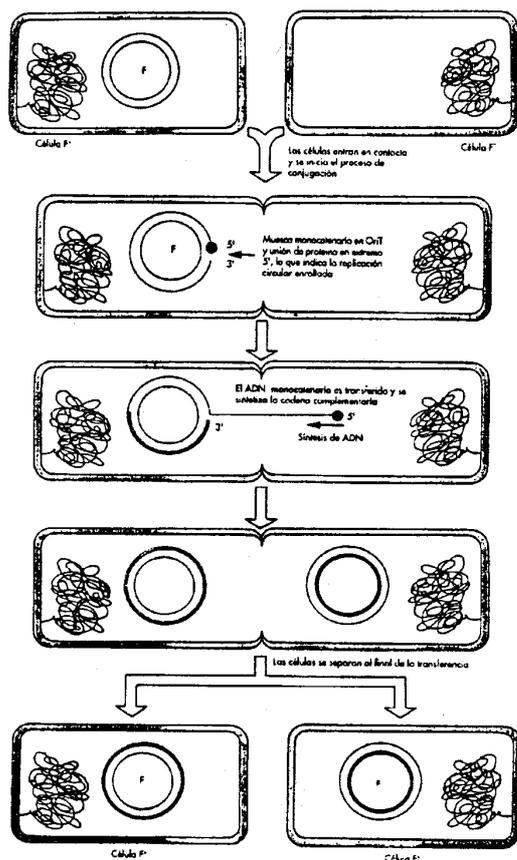
Las mutaciones **puntuales**, son aquellas que implican un cambio en una única base, y pueden provocar que se cambie un aminoácido por otro en el producto proteico (mutación por cambio de sentido). Otras veces no se traducen en ningún cambio (mutación silenciosa), ya que como sabemos existe más de un 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** dan lugar a cambios más notorios en el ADN, provocando la pérdida o la incorporación de cualquier número de pares de bases, por lo que siempre que este no sea un múltiplo de 3 se producirán mutaciones por desplazamiento del marco de lectura que suelen 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.

La **recombinación genética** es el proceso mediante el cual elementos genéticos contenidos en genomas de diferentes individuos se combinan, lo que permite que el individuo lleve a cabo alguna nueva función y que puede 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 procariontes comprende una serie de mecanismos independientes del evento de reproducción



**Figura 8.** Transferencia genética del plásmido F mediante conjugación.

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 o extraño, proveniente de otras bacterias, que se encuentra libre en el medio.

La virulencia del *Streptococcus pneumoniae* guarda relación con la presencia de cápsula polisacáridica 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 resultaba letal. De esto concluyó que las R habían sido sustituidas o "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**. La competencia

depende de la presencia de un sistema de captación de ADN específico asociado a una membrana (Fig. 6).

Ejemplos de bacterias con competencia natural son *Haemophilus influenzae*, *Neisseria sp.*, *Streptococcus pneumoniae* y ciertas especies de *Bacillus*. Si bien 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 mediante pulsos eléctricos (electroporación) o mediante cambios osmóticos y térmicos. Estos procedimientos son muy utilizados 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 es llevada a cabo 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 (Fig. 8). La conjugación se produce en la mayoría de las eucariotas, entre miembros de la misma especie, pero se ha demostrado también entre procariontes y células vegetales, animales y hongos.

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 lo constituye el **plásmido F** de *E. coli* que codifica diversas proteínas necesarias para la conjugación, incluyendo el **pili sexual**. Esta es una estructura especializada esencial para el contacto entre la bacteria donadora y la

receptora. En general, los plásmidos conjugadores solamente causan la transferencia de su propio material genético pero en ocasiones el plásmido puede integrarse al cromosoma bacteriano y por tanto al 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 2 hs, pero la unión entre las bacterias por medio del pili persiste menos tiempo.

Las cepas bacterianas con el *plásmido F* tienen una gran capacidad de recombinación por lo que se denominan cepas **hfr** (high frequency of recombination). Debemos recordar que este es un mecanismo muy efectivo para la transferencia de genes de resistencia antibióticos.

### APORTES DE LA BIOLOGIA MOLECULAR Y LA GENETICA BACTERIANA A LA MEDICINA

Una de las contribuciones más grandes de la ingeniería genética de bacterias, es su uso para el desarrollo de **vectores** o vehículos que permiten el **clonado** de cualquier secuencia de ADN. Los vectores más ampliamente utilizados 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 autoreplicarse y son elementos génicos factibles de ser transferidos entre bacterias e introducidos en

(como el pBR322 o el pUC) y también vectores 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.

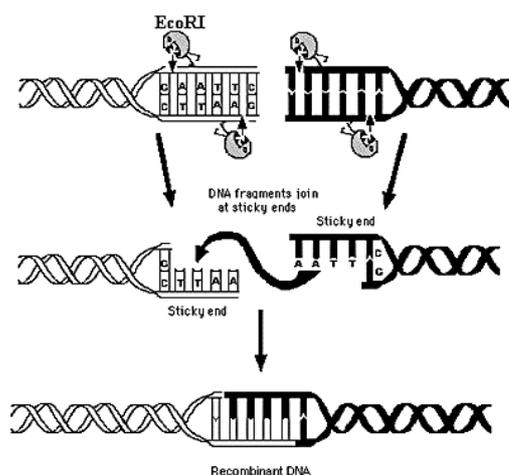
Para clonar un gen cualquiera en un plásmido, es necesario en primer lugar cortar el ADN plasmídico y el ADN del cual procede el gen a clonar, para luego ligarlos de la manera deseada. Para esto, existen unas valiosas herramientas de la ingeniería genética, que son las **enzimas de restricción**. Muchas bacterias, sintetizan este tipo de enzimas, que son capaces de cortar hebras de ADN extrañas 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 Fig.)

Así, luego que EcoRI ha cortado, quedarán bases sin aparear, que estarán disponibles para aparearse con otro fragmento de ADN que posea las bases complementarias. Si cortamos 2 fragmentos de ADN con esta enzima, y mezclamos los productos de esa reacción, se obtendrá un producto recombinante, combinación de los 2 ADN originales.

Estas enzimas, que han sido mucho tiempo purificadas y hoy se producen comercialmente, son utilizadas para clonar genes en por ejemplo un plásmido bacteriano.

De esta manera, es posible por estos métodos 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 de ADN que contiene el gen. Una vez obtenido el fragmento de ADN de interés y cortado el plásmido a ser utilizado como vector con las mismas enzimas de restricción, estaremos en condiciones de ligar ambos fragmentos de ADN, valiéndonos de las propiedades de complementariedad de bases del ADN, construyendo lo que se llama un **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. (Fig. 9)

Utilizando estos procedimientos de clonado y expresión de genes, actualmente se producen muchas proteínas que son utilizadas para el tratamiento de diversas enfermedades humanas, como por ejemplo la diabetes, al producir la hormona humana insulina u otras como la



### Restriction Enzyme Action of EcoRI

una cepa deseada, por lo que constituyen buenos vectores de clonación. Actualmente existen varios tipos de vectores, algunos plasmídicos

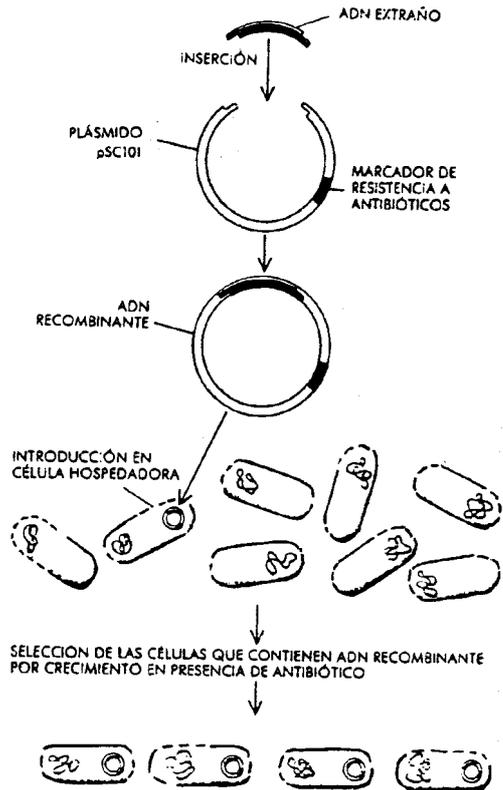
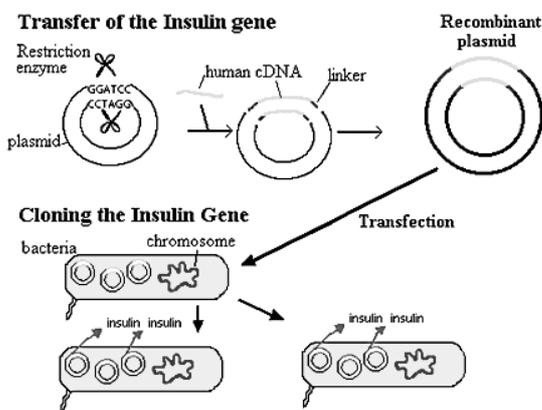


Figura 9. - Clonación de ADN en un plásmido.

hormona de crecimiento o el interferón, en bacterias recombinantes obteniendo cantidades suficientes como para su aislamiento y uso terapéutico.

Por otra parte, 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 fármacos antimicrobianos. 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.



Transfer and cloning of the Insulin gene

Otra importante aplicación de la biología molecular a la medicina, es la producción de vacunas recombinantes contra infecciones víricas o parasitarias, en bacterias. Este procedimiento, se basa en la expresión en bacterias de genes de patógenos que codifican por ejemplo antígenos de superficie del virus o del parásito contra el que se desea vacunar, que sean capaces de actuar como inmunógenos adecuados en la vacunación. Así, clonando los genes apropiados en los microorganismos adecuados, podrán producirse grandes cantidades del antígeno puro. Este método, proporciona la ventaja de que se evita trabajar con microorganismos patógenos. El desarrollo de la vacuna contra la hepatitis B representa el primer éxito de las vacunas recombinantes. Esta vacuna, es producida en una levadura, que ha sido transformada previamente con un vector recombinante que contiene el gen del virus clonado, encargado de codificar para una proteína de superficie inmunogénica.

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

### BIOTECNOLOGIA APLICADA AL DIAGNOSTICO CLINICO

Otra utilidad de la producción de antígenos a escala industrial en bacterias, es para la realización de 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 montada por el paciente. De esta manera se producirá el antígeno proteico en cantidad suficiente, como para utilizarlo como "captura" de anticuerpos en la técnica elegida para la prueba diagnóstica, ya sea esta 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 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, portados tanto por su cromosoma 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 varios de estos genes y hoy día 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 especialmente importante, en los casos en que no alcanza con identificar a nivel de especie una cepa bacteriana aislada de una muestra patológica, para poder 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* forma parte de la microflora normal del tracto 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 alcanzan a colonizar el tracto gastrointestinal, a través de la ingesta de alimentos o agua contaminados, son capaces de multiplicarse a ese nivel y causar un proceso infeccioso que se manifiesta con un cuadro diarreico. 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, que la capacitan para adherirse a la mucosa intestinal. Entonces, a la hora de establecer un diagnóstico clínico microbiológico en un cuadro diarreico, por ejemplo en un lactante (rango etario donde *E. coli* es el primer agente causal de diarrea) no alcanzará con identificar fenotípicamente como *E. coli* una cepa aislada del coprocultivo, sino que habrá que determinar que esta cepa posee los determinantes de patogenicidad adecuados. Una opción para esto, es hoy identificar la presencia de los genes que codifican para estos determinantes.

Para esto, se han desarrollado técnicas denominadas 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, que ha sido 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 ésta posee el gen X cuya secuencia conozco, podremos construir una sonda específica para dicho gen, extraer el ADN del cultivo y mezclarlo con nuestra sonda, en condiciones que permitan desnaturalizar la estructura de doble cadena del ADN para permitir que la sonda logre hibridar con su secuencia complementaria. De esta forma, podremos evidenciar si nuestro cultivo posee o no el gen buscado, ya que de estar presente, encontraremos la marca correspondiente a la sonda incorporada en la estructura del ADN. Esta técnica puede utilizarse aplicando la sonda directamente sobre una muestra clínica, por ejemplo una sección tisular, y en ese caso se denomina **hibridación in situ**.

Hoy día se dispone de muchas sondas específicas de ADN empleadas para el diagnóstico de muchas enfermedades bacterianas. La hibridación por sondas, así como otros métodos que comentaremos para detectar un gen en particular, es especialmente útil para realizar el diagnóstico etiológico de infecciones producidas por microorganismos cuyo cultivo es difícil, ya sea por un crecimiento muy lento, como puede ser el caso de *Micobacterium sp.*, o por tener requerimientos especiales para su cultivo y aislamiento, como en *Chlamidia sp.* y *Rickettsia sp.* o en los virus.

El mayor problema en el diagnóstico utilizando hibridación por sondas, ha sido la baja sensibilidad de la técnica, ya que se requiere que en la muestra existan suficientes copias del gen buscado, como para que la marca correspondiente a la sonda sea detectada. En general, las técnicas de hibridación *in situ* con sondas no radioactivas, son capaces de detectar solo más de 200 copias del gen. Por esto, muchas veces la sensibilidad de la técnica no es suficiente como para descartar como muestras negativas a aquellas con las que se obtienen resultados negativos.

Uno de los más interesantes avances en el área de 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**, más conocida por su sigla en inglés **PCR**, permite la generación de millones de copias exactas de un fragmento de ADN, a partir de tan solo 1 copia original en apenas 2 o 3 horas. La PCR se basa en las propiedades de la replicación del ADN, que

## POLYMERASE CHAIN REACTION

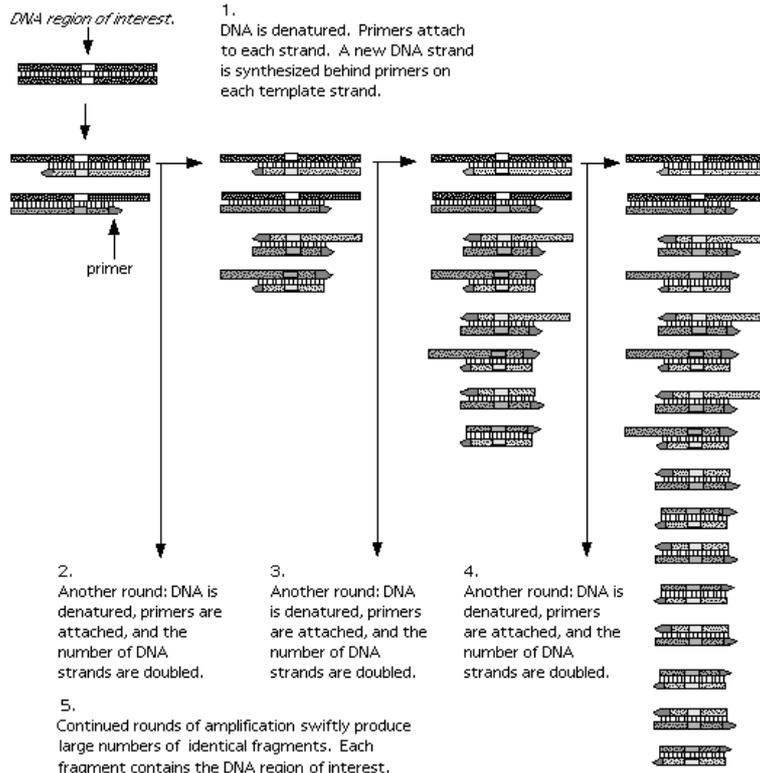


Fig. 11. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)  
Se parte de primers específicos para la secuencia de interés. Se desnaturaliza el ADN (94 °) y los primers se unen en sus secuencias complementarias. (a la temp. adecuada según los primers, aprox. 55°). Luego la polimerasa sintetiza a partir de cada primer copiando la cadena molde ( a 72°). Así se completa un ciclo, repitiéndose el proceso unas 30 veces, luego de lo cual se logra multiplicar la secuencia de interés en forma exponencial.

puede reproducirse in vitro si se coloca el ADN molde, en una mezcla de reacción con una enzima ADN polimerasa, nucleótidos y cebadores específicos para las regiones flanqueantes del fragmento que se desea amplificar. Esta mezcla, se coloca en condiciones de pH y osmóticas tales que permitan el funcionamiento adecuado de la polimerasa, y en condiciones de temperatura distintas. Primero, a altas temperaturas (94 o 95 grados) para lograr que el ADN se desnaturalice, es decir que se separen ambas hebras; segundo, a temperaturas adecuadas para que los cebadores hibriden con el ADN molde (entre 40 y 55 grados, según los cebadores); y en tercer lugar, a la temperatura adecuada para que la

polimerasa de ADN lleve a cabo el proceso de replicación. Las polimerasas que se utilizan para esto, deben ser capaces de tolerar estas altas temperaturas de desnaturalización del ADN, por lo que la enzima utilizada, corresponde a una bacteria termófila, *Thermus aquaticus*, por lo cual se la llama **Taq polimerasa**, cuya temperatura óptima es de 72 grados. Hoy día se utiliza ésta y también otras enzimas, producidas en forma recombinante en *E. coli*.

Estos cambios de temperatura, se realizan en un equipo conocido como termociclador, que es capaz de variar entre rangos muy amplios de temperatura en tiempos muy cortos. Este ciclo de temperaturas, por ejemplo 94° por 1 minuto, 45° por 1,5 minutos y 72 ° por 1,5 minutos

se repite unas 30 veces, con lo que se logra que en cada ciclo se duplique el número de copias de cada una de las hebras del ADN molde, con lo que se logra un crecimiento exponencial. (ver Fig. 11 )

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

Para revelar el resultado del ensayo, la mezcla de reacción debe ser utilizada como muestra en una **corrida electroforética** en gel de agarosa o de poliacril amida, en donde el ADN migra desde el polo negativo al positivo, en mayor o menor medida según su peso molecular, es decir su tamaño en pares de bases. El fragmento a amplificar, es por supuesto de un tamaño conocido, por lo que podrá determinarse la presencia del gen buscado en la muestra, porque habrá amplificado en la reacción y presentará una banda del tamaño correspondiente en el gel. (Ver Fig. 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 el caso de 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, resulta en un "teñido" del gel, ya que el bromuro de etidio tiene la propiedad de

fluorescer bajo luz ultravioleta, por lo que al ser expuesto el gel a UV, se evidenciará la presencia o ausencia de la banda correspondiente. En el caso de los geles de poliacrilamida, el revelado puede realizarse por tinción con nitrato de plata.

El resultado de la PCR, también puede hacerse evidente, 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 poner a ésta 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**.

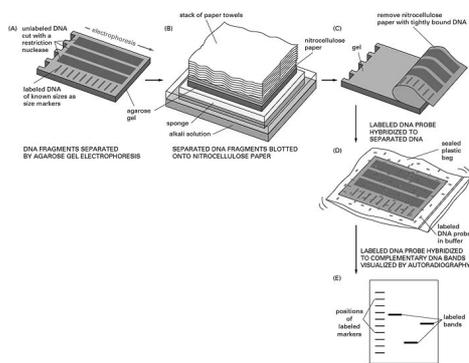


Fig. 12. Corrida electroforética en gel de agarosa, para revelar una reacción de PCR. En el carril de la derecha se observa un marcador de peso molecular y en los dos carriles anteriores el producto de la amplificación del tamaño esperado. En el primer carril la muestra no contenía la secuencia de interés.

Si bien hemos centrado el interés de estas técnicas de detección de ácidos nucleicos para el diagnóstico de las enfermedades infecciosas, también son muy utilizados hoy día para diagnosticar una amplia gama de enfermedades como 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 más la biología molecular aporta conocimientos y tecnología aplicables a la mejora de la calidad de vida y la salud humana.

**BIBLIOGRAFIA**

- "Microbiología. Mecanismos de las enfermedades infecciosas". Schaechter, Medoff, Eisenstein. Ed. Panamericana.
- "Zinsser. Microbiología médica". Joklik, Willett, Amos, Wilfert. Ed. Panamericana
- "Genes". B. Lewin. Ed. Reverté.
- "Microbiología médica" Murray, Kobayashi, Pfuller, Rosenthal. Ed. Harcourt Brace.
- "ADN recombinante. Introducción a la ingeniería genética". Watson, Tooze, Kurtz. Ed. Labor.