

See discussions, stats, and author profiles for this publication at: <https://www.researchgate.net/publication/288670559>

Genética microbiana

Chapter · January 2001

CITATIONS

0

READS

37,689

2 authors, including:



[Raquel De los Ángeles Junco Díaz](#)

National Institute of Hygiene, Epidemiology and Microbiology

51 PUBLICATIONS 406 CITATIONS

SEE PROFILE

A graphic featuring a large, stylized number '8' in blue, set against a light blue and yellow circular background. The word 'Capítulo' is written in blue above the '8'. A horizontal blue line extends from the right side of the '8' across the page.

Capítulo

8

Genética microbiana

Raquel de los A. Junco Díaz
Carlos M. Rodríguez Pérez

INTRODUCCIÓN

La genética es la ciencia que define y analiza la herencia o la constancia y cambio de las funciones fisiológicas que constituyen las propiedades de los organismos. La unidad de la herencia es el gen, segmento de ADN que contiene en su secuencia de nucleótidos, información para una propiedad bioquímica o fisiológica específica. Las dos funciones esenciales del material genético son la replicación y la expresión. El material genético debe replicarse de una forma perfecta, de manera que la progenie herede todos los determinantes genéticos específicos (el genotipo) de los progenitores. La expresión del material genético específico bajo un conjunto particular de condiciones de crecimiento determina las características observables (fenotipo) del organismo. El fenotipo está constituido por las propiedades estructurales y fisiológicas colectivas de una célula o de un organismo. La base química para la variación en el fenotipo es un cambio en el genotipo, o una alteración en la secuencia del ADN dentro de un gen, o en la organización de los genes.

La genética microbiana tradicional se apoya, en gran parte, en la observación del crecimiento microbiano. Las bacterias tienen pocos rasgos estructurales o de desarrollo que puedan ser observados fácilmente, pero poseen una vasta disposición de capacidades bioquímicas y patrones de susceptibilidad a los agentes antimicrobianos o a los bacteriófagos.

La variación fenotípica se ha estudiado basada en la capacidad de un gen para permitir la proliferación en condiciones de selección; por ejemplo, una bacteria que contiene un gen que le confiere resistencia a la ampicilina, puede distinguirse de una bacteria que carece del gen, por su crecimiento en presencia del antibiótico, el cual sirve como agente de selección. Nótese que la selección del gen requiere su expresión, la cual, en condiciones apropiadas, puede ser observada a nivel de fenotipo.

La genética microbiana ha descubierto que los genes están constituidos por ADN, observación en la que descansa la biología molecular. Investigaciones subsecuentes sobre las bacterias, revelaron la presencia de enzimas de restricción que rompen el ADN en sitios específicos, dando origen a fragmentos de restricción de ADN. Se han identificado plásmidos como elementos genéticos pequeños con capacidad de replicación independiente en bacterias y en levaduras.

ORGANIZACIÓN DEL GENOMA

El cromosoma bacteriano es una molécula circular de ADN que funciona como un elemento genético autorreplicable (replicón). En algunas cepas de *Escherichia coli*, el cromosoma es solamente el replicón presente en la célula. Otras cepas bacterianas tienen replicones adicionales, tales como plásmidos y bacteriófagos, los cuales a menudo determinan resistencia a agentes antimicrobianos, producción de factores de virulencia u otras funciones. El cromosoma se replica semiconservativamente; cada banda de ADN sirve como molde para la síntesis de su banda complementaria.

ESTRUCTURA DEL ÁCIDO NUCLEICO

Los ácidos nucleicos son grandes polímeros constituidos por unidades nucleótidas que se repiten. Cada nucleótido contiene un grupo fosfato, un azúcar que puede ser pentosa o desoxipentosa y un par de bases púricas o pirimidínicas. La información genética se almacena como una secuencia de bases en el ácido desoxirribonucleico (ADN). En la mayoría de los organismos, la información genética está codificada en el ADN, pero en algunos virus se encuentra en el ARN. Los virus bacterianos (bacteriófagos o fagos) tienen como material genético ADN o ARN.

El ADN (Fig. 8.1) contiene el azúcar D-2-desoxirribosa, las bases púricas son adenina (A) y guanina (G), y las bases pirimidínicas son timina (T) y citosina (C). La mayor parte de las moléculas de ADN son de doble tira, helicoidales y las dos bandas en la hélice son antiparalelas y complementarias. La doble hélice está estabilizada por puentes de hidrógeno, en el centro de la molécula, entre las bases púricas y pirimidínicas sobre la banda complementaria. En cada posición, el par de bases A por dos enlaces de hidrógeno con T ($A = T$) en la banda complementaria o los pares G por tres enlaces de hidrógeno con C ($G \equiv C$). Debido a su complementaridad, la doble cadena de ADN contiene cantidades equimolares de purinas ($A + G$) y pirimidinas ($T + C$), con igual cantidad de A y T, y G igual que C, pero la fracción molar de $G + C$ en el ADN varía ampliamente entre los diferentes microorganismos. La extensión de la secuencia homóloga entre los ADN de diversos microorganismos es el criterio más exacto para determinar cómo ellos están estrechamente relacionados.

El ARN se encuentra con más frecuencia en forma de una tira sencilla. El azúcar que posee es la D-ribosa y la base uracilo (U) reemplaza a la timina del ADN. La forma global de las moléculas de tira sencilla del ARN, se define por hibridación entre secuencias de bases que forman asas o lazos, de manera que las tiras sencillas de ARN asumen una estructura compacta, capaz de expresar la información genética contenida en el ADN. La actividad más general del ARN es comunicar la secuencia de genes del ADN, en la forma de ARN mensajero (ARNm), a los ribosomas. Dentro de los ribosomas, que contienen ARN ribosómico (ARNr), los mensajes son traducidos con ayuda del ARN de transferencia (ARNt), en secuencias de aminoácidos que constituyen las proteínas.

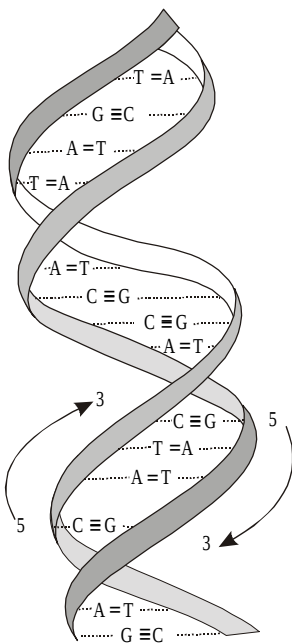


Fig. 8.1. Estructura de doble hélice del ADN.

GENOMA EUCARIÓTICO

En el genoma se encuentra la totalidad de la información genética de un organismo. Casi todo el genoma eucariótico está contenido en dos cromosomas lineales, separados del citoplasma por la membrana nuclear.

En las células eucarióticas diploides, con frecuencia no pueden detectarse mutaciones o cambios genéticos, debido a que la contribución de una copia genética compensa los cambios en la función de su homóloga. Un gen que no logra la expresión fenotípica en presencia de su homólogo, es recesivo; en tanto que un gen que supera el efecto de su homólogo es dominante. Los efectos de las mutaciones pueden discernirse con facilidad en las células haploides, las cuales portan una copia simple de la mayor parte de los genes. Las células de levaduras suelen usarse en investigaciones, ya que pueden conservarse y analizarse en el estado haploide.

Las células eucarióticas contienen mitocondrias y, en algunos casos, cloroplastos, en cuyo interior hay una molécula circular de ADN constituida por unos cuantos genes, cuya

función se relaciona con esos organelos en particular. No obstante, la mayor parte de los genes necesarios para la actividad de estos organelos se encuentra en los cromosomas eucarióticos.

Muchas levaduras contienen un elemento genético adicional que se replica de manera independiente. Esos círculos pequeños de ADN, llamados plásmidos, se hallan frecuentemente en los procariotes.

A diferencia del ADN procariótico, el ADN eucariótico posee grandes cantidades de material repetido que no codifica función alguna.

GENOMA PROCARIÓTICO

El genoma bacteriano varía en tamaño, algunos de los más pequeños pertenecen a parásitos obligados (*Mycoplasma*) y los más grandes, a bacterias capaces de una diferenciación compleja, tal como *Mixococcus*.

En los procariotes no hay membranas que separen los genes del citoplasma como ocurre en los eucariotes y la mayor parte de los genes se encuentran en el cromosoma bacteriano. Con pocas excepciones, los genes bacterianos son haploides y presentan un cromosoma único constituido por una molécula circular de ADN de doble cadena. Sin embargo, han sido hallados cromosomas lineales en bacterias grampositivas como *Borrelia* y *Streptomyces* sp., y un cromosoma lineal y otro circular está presente en la bacteria gramnegativa *Agrobacterium tumefaciens*.

El cromosoma de *E. coli* tiene un largo aproximado de 1,35 mm, cientos de veces más largo que la célula bacteriana, pero el ADN está apretadamente empaquetado en el nucleoide bacteriano. El tiempo requerido para la replicación del cromosoma entero es cercano a los 40 minutos, lo cual es aproximadamente el doble del tiempo más corto de división para esta bacteria. La replicación del ADN tiene que ser iniciada tan frecuente como la célula se divide; así, en bacterias que crecen rápido un nuevo ciclo de replicación cromosómica comienza antes de que el ciclo anterior se haya completado. A este ritmo rápido de crecimiento pueden haber cuatro cromosomas replicándose para formar ocho en el momento de la división celular, lo cual está acoplado con el completamiento de un ciclo de replicación cromosómica. De esta forma, el cromosoma de las bacterias que crecen rápidamente se replica en más de un punto. La replicación del ADN cromosómico en las bacterias es complejo e involucra muchas proteínas diferentes.

Muchas bacterias contienen genes adicionales en los plásmidos. Los círculos de ADN (cromosoma y plásmidos), que contienen información genética necesaria para su propia replicación, se denominan *replicones*.

Los genes esenciales para la proliferación bacteriana están contenidos en el cromosoma, y los plásmidos portan genes relacionados con funciones especializadas, por ejemplo, la resistencia a antibióticos transmitidas por los plásmidos.

Los transposones son elementos genéticos que contienen la información necesaria para su emigración de un locus genético a otro. Los transposones simples sólo contienen información genética para insertación y los transposones complejos poseen genes para funciones especializadas, como la resistencia a los antibióticos, y están flanqueados por secuencias para inserción. Al contrario de los plásmidos, los transposones no contienen la información genética necesaria para su propia replicación. La selección de transposones depende de su replicación como parte de un replicón. La identificación o la exploración genética de los transposones se logra por selección de la información genética especializada (normalmente, resistencia a un antibiótico) que ellos poseen.

GENOMA VIRAL

Los virus son parásitos obligados intracelulares capaces de sobrevivir, pero no de proliferar, en ausencia de una célula huésped. La replicación del genoma viral depende de la energía metabólica y de la maquinaria sintetizadora de macromoléculas del hospedero. Con

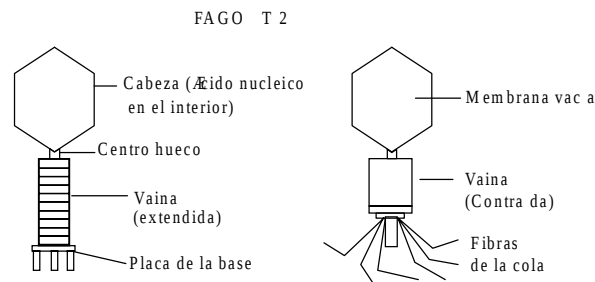
frecuencia esta modalidad de parasitismo genético causa debilitamiento o muerte de la célula hospedera. Por tanto, la propagación con éxito del virus requiere:

1. Una forma estable que le permita sobrevivir en ausencia de su hospedero.
2. Un mecanismo para invadir las células.
3. La información genética necesaria para la replicación de componentes virales dentro de la célula.
4. La información adicional para el ensamblaje de los componentes virales y la liberación de los virus formados, al exterior celular.

Por lo común, se hacen distinciones entre los virus relacionados con los eucariotes y aquellos que infectan a los procariotes; estos últimos virus se denominan *bacteriófagos*.

La molécula del ácido nucleico del bacteriófago está rodeada por una cubierta de proteínas. El ácido nucleico del fago muestra una variabilidad considerable. Muchos de los fagos contienen ADN de doble tira, otros ARN de tira sencilla y algunos más poseen ADN de tira sencilla. Muchos fagos contienen estructuras especializadas tipo jeringuilla, que se adhieren a receptores de la superficie celular e inyectan el ácido nucleico del fago a la célula hospedera (Fig. 8.2).

Fig. 8.2. Diagramas del fago T2 basados en observaciones de microfotografía electrónica.



REPLICACIÓN DEL ADN

Durante la replicación cada banda helicoidal del ADN sirve como un molde para la síntesis de una nueva banda complementaria. Cada molécula de doble cadena de ADN hija contiene una banda de polinucleótido vieja y una banda nueva sintetizada. Este tipo de replicación del ADN se denomina *semiconservativo*.

ADN EUCARIÓTICO

La replicación del ADN en los eucariotes comienza en varios puntos de crecimiento a lo largo del cromosoma lineal. La replicación exacta de los extremos del cromosoma lineal, requiere actividades enzimáticas diferentes de las funciones normales relacionadas con la replicación del ADN. Los eucariotes han desarrollado una maquinaria especializada, conocida como huso, que atrae a los cromosomas hijos para formar núcleos nuevos, separados por el proceso de mitosis. Una división más extensa de los núcleos por meiosis, divide en dos el número cromosómico de las células diploides para formar células haploides. La agregación apropiada de cromosomas durante las divisiones reductivas de la meiosis es un factor importante en el mantenimiento de la estructura cromosómica dentro de una especie. Con frecuencia, las células haploides son gametos. La formación de gametos seguida por su fusión para formar cigotos diploides, es el origen primario de la variabilidad genética por recombinación en los eucariotes.

ADN BACTERIANO

La replicación del ADN cromosómico en las bacterias comienza en un sitio específico del cromosoma llamado *locus ori*, una región del ADN que se plantea está unida a la membrana celular y procede bidireccionalmente desde el punto de origen hasta que el proceso se completa. Cuando la bacteria se divide por fisión binaria después de completada la replicación del ADN, los cromosomas replicados se dividen en cada una de las células hijas. Esas características de la replicación del ADN durante el crecimiento bacteriano cumple los requerimientos del material genético para ser reproducido perfectamente y ser heredado por cada célula hija en el momento de la división celular.

TRANSPOSONES

Son segmentos de ADN que pueden moverse de un sitio a otro en una molécula de ADN o a una molécula diferente de ADN. El proceso se denomina *transposición* y ocurre por un mecanismo que es independiente de la recombinación generalizada. Los transposones son elementos genéticos importantes ya que ellos causan mutaciones, mediadas por reordenamiento genómico, las cuales funcionan como regiones portátiles de homología genética y adquieren nuevos genes, así como contribuyen a su diseminación en las poblaciones bacterianas. La inserción de un transposón a menudo interrumpe la secuencia lineal de un gen y lo inactiva. Los transposones desempeñan su mayor rol causando supresiones, duplicaciones e inversiones de segmentos de ADN, así como fusiones entre los replicones. Los transposones no son elementos genéticos autorreplicables; sin embargo, deben integrarse en otro replicón para mantener la estabilidad en los genomas bacterianos.

La mayoría de los transposones comparten un número de rasgos comunes. Cada transposón codifica las funciones necesarias para su transposición, incluyendo la enzima transposasa que interactúa con secuencias específicas al final del transposón. Durante la transposición se duplica una secuencia corta del ADN blanco y el transposón se inserta directamente entre la secuencia repetida. La longitud de esta duplicación corta varía, pero es característica para cada transposón. Se han reconocido dos tipos de transposición. La excisión de un transposón a partir de un sitio donante seguido por su inserción en un sitio blanco, se denomina *transposición no replicativa*. Si el transposón se replica en un sitio donante y una copia se inserta en el sitio blanco, el proceso se nombra *transposición replicativa*. El proceso de transposición replicativa puede involucrar la formación de una simple y cointegrada molécula circular de ADN que consta de dos replicones unidos con copias del transposón en una secuencia alternativa.

La mayoría de los transposones en las bacterias pueden ser separados dentro de tres clases principales. Secuencias de inserción y transposones afines relacionados comprenden la primera clase. Las secuencias de inserción son las más simples en estructura y codifican solamente las funciones necesarias para la transposición. La segunda clase de transposón comprende de la gran familia homóloga TnA. Todos los miembros de la familia codifican tanto para las funciones transposasa y resolvasa. Ejemplos bien conocidos de esta familia incluyen el transposón de resistencia a la ampicilina Tn3 y Tn1000 encontrados en el plásmido F. La familia TnA tiene un lugar importante en la historia de la microbiología médica. El desarrollo de resistencia de alto nivel a la ampicilina en *Haemophilus influenzae* y *Neisseria gonorrhoeae* durante la década de 1970, limitó severamente la utilidad de la ampicilina para el tratamiento de la gonorrea y las infecciones por *Haemophilus* en áreas donde tales cepas se convirtieron en prevalentes, lo que fue causado por la diseminación de los determinantes de resistencia a la ampicilina de los transposones TnA en plásmidos de *Enterobacteriaceae* a plásmidos de *Haemophilus* y *Neisseria*.

La tercera clase de transposón consiste del bacteriófago Mu y fagos moderados relacionados. El genoma completo del fago funciona como un transposón y la replicación del ADN del fago ocurre por transposición vegetativa durante el crecimiento vegetativo. La integración del profago puede ocurrir en diferentes sitios en el cromosoma bacteriano y a menudo causa mutaciones. Por esta razón Mu y otros fagos relacionados son llamados, en ocasiones, *fagos mutantes*.

Una cuarta clase de transposones, descubiertos en bacterias grampositivas y representados por Tn917, consta de transposones conjugativos y que son completamente diferentes de los anteriormente descritos. Estos transposones no generan una duplicación de la secuencia blanco en la cual se insertan, y en las bacterias grampositivas, la cepa hospedero que porta el transposón puede actuar como un donante conjugante. La bacteria receptora no necesita estar estrechamente relacionada con la bacteria donadora. El transposón es extraído desde el cromosoma del donante y transmitido por conjugación al receptor, mientras se integra fortuitamente en el cromosoma. Tn917 codifica resistencia a la tetraciclina, pero otros transposones conjugativos mayores pueden codificar resistencia antibiótica adicional. Los transposones conjugativos parecen ser una de las mayores causas de diseminación de la resistencia a antibióticos en las bacterias grampositivas.

Las bacterias coleccionadas durante la era preantibiótica contenían muchos plásmidos, pero usualmente carecían de determinantes de resistencia. Muchos de los plásmidos R de aislamientos clínicos comunes pertenecen a los mismos grupos de incompatibilidad de los plásmidos encontrados previamente; pero ellos, además, determinan resistencia a múltiples antibióticos. La estrecha relación entre sus replicones proveen una fuerte evidencia de que muchos plásmidos R comunes evolucionaron de plásmidos viejos por adquisición de determinantes de resistencia. Algunos de los plásmidos de resistencia a múltiples antibióticos tienen transposones individuales con diferentes determinantes de resistencia; otros poseen transposones de resistencia múltiple situados en sitios separados y otros contienen transposones complejos de resistencia híbrida formados por integración de un transposón en otro.

El uso terapéutico de antibióticos y su incorporación en la alimentación animal proporciona ventajas selectivas para las bacterias con plásmidos R, mientras que la conjugación, la transformación y la transducción facilitan la vía para la diseminación de los plásmidos R en y entre las especies bacterianas. Después que un plásmido que porta un transposón es introducido en una nueva bacteria hospedera, el transposón y sus determinantes pueden saltar dentro del cromosoma o plásmidos nativos del nuevo hospedero. Por lo tanto, la estabilidad de la movilización del plásmido en un nuevo hospedero bacteriano no es esencial para la persistencia de los determinantes genéticos situados en un transposón.

PLÁSMIDOS

Los plásmidos son replicones que se mantienen como elementos genéticos distintos, extracromosómicos en las bacterias. Por lo general, son mucho más pequeños que el cromosoma bacteriano, codifican rasgos que no son esenciales para la viabilidad bacteriana y se replican independientemente del cromosoma. La mayoría son moléculas de doble cadena de ADN, circular, aunque se han demostrado plásmidos lineales en *Borrelia* y *Streptomyces*. Los plásmidos estrechamente relacionados o idénticos han demostrado incompatibilidad; no pueden mantenerse de forma estable en la misma bacteria hospedero. La clasificación de los plásmidos está basada en la incompatibilidad o en el uso de ensayos específicos de ADN en pruebas de hibridización para identificar secuencias de nucleótidos que son característicos de replicones específicos de plásmidos. Algunos plásmidos hibridizados contienen más de un replicón.

Los plásmidos conjugativos codifican funciones que promueven la transferencia del plásmido de una bacteria donante a otra receptora, pero los plásmidos no conjugativos no lo hacen. Los plásmidos conjugativos que además promueven la transferencia del cromosoma bacteriano de una bacteria donante a otra receptora, se denominan *plásmidos fértiles*. Los grandes plásmidos (más de 40 kilobases de pares) son a menudo conjugativos, tienen un pequeño número de copias (de una a varias por cromosoma), codifican para todas las funciones requeridas para su replicación y se reparten por sí mismos entre las células hijas durante la división celular de la misma forma que el cromosoma bacteriano. Los plásmidos más pequeños que 7,5 kilobases de pares son usualmente no conjugativos, tienen un alto número de copias (típicamente 10-20 por cromosoma), cuentan con su hospedero bacteriano y suministran algunas funciones requeridas para su replicación, además, son distribuidos al azar entre las células hijas durante la división celular.

Muchos plásmidos controlan propiedades médicamente importantes de bacterias patogénicas, incluyendo la resistencia a uno o varios antibióticos, producción de toxinas y síntesis de estructuras de la superficie celular requeridas para la adherencia o colonización. Los plásmidos que determinan resistencia a los antibióticos son a menudo llamados plásmidos R (o factores R). Ejemplos de toxinas codificadas por plásmidos incluyen: las enterotoxinas termolábiles y termoestables de *E. coli*, la toxina exfoliativa de *Staphylococcus aureus* y la toxina tetánica de *Clostridium tetani*. Algunos plásmidos están ocultos y no tienen efectos reconocibles sobre las células bacterianas que los hospedan. La comparación de perfiles de plásmidos es un método útil para medir la posible relación de aislamientos clínicos individuales de una especie bacteriana particular para estudios epidemiológicos.

BACTERIOFAGOS

Los bacteriófagos (virus bacterianos, fagos) son agentes infecciosos que se replican como parásitos obligados intracelulares en las bacterias. Las partículas de fago extracelulares son metabólicamente inertes y consisten, sobre todo, de proteínas más ácido nucleico (ADN o ARN, pero no ambos). Las proteínas de la partícula del fago forman una capa protectora (cápside) que rodea el ácido nucleico del genoma apretadamente empaquetado. El genoma del fago consta de ADN de doble cadena o ADN o ARN de una sola cadena, y al igual que en los plásmidos, codifica las funciones requeridas para su replicación en la bacteria; pero a diferencia de los plásmidos codifica, además, las proteínas de la cápside y proteínas no estructurales que requiere para su ensamblaje. Se han descrito diferentes tipos morfológicamente distintos de fagos, que incluyen: poliédricos, filamentosos y complejos. Los fagos complejos tienen una cabeza poliédrica unida a una estructura proteica helicoidal (la cola), cuyo conjunto le hace adoptar una forma que recuerda al espermatozoide humano.

La infección se inicia por la adsorción del fago a los receptores específicos sobre la superficie de la bacteria hospedero susceptible. Las cápsides permanecen en la superficie celular, y el genoma ADN o ARN penetra en la célula. A causa de que la infectividad del ADN o ARN genómico es mucho menor que la del virus maduro, hay un tiempo inmediatamente después de la infección que se llama *período de eclipse*, durante el cual el fago infeccioso intracelular no puede ser detectado. Los fagos infectantes ARN o ADN se replican para producir nuevas copias de genomas del fago, y se producen las proteínas específicas. En la mayoría de los fagos el ensamblaje de la progenie ocurre en el citoplasma, y la salida ocurre por lisis celular. En contraste, los fagos filamentosos se forman en la envoltura celular y son liberados sin la muerte de la célula hospedero. El período de eclipse finaliza cuando la progenie infecciosa intracelular aparece.

Los fagos se clasifican en dos grandes grupos: virulentos y temperantes. El crecimiento de los *fagos virulentos* en una bacteria susceptible destruye las células hospederas. La infección de una bacteria susceptible por *fagos temperantes* puede tener dos desenlaces: crecimiento lítico o lisogenia. El *crecimiento lítico* de los bacteriófagos virulentos y temperantes es similar, conduciendo a la producción de una progenie de fagos y muerte de la bacteria hospedera. La *lisogenia* es un tipo específico de infección viral latente, en la cual el genoma del fago se replica como un profago en la célula bacteriana. En la mayoría de las bacterias lisogénicas los genes que se requieren para el desarrollo de un fago lítico no están expresados y no ocurre la producción de fagos infecciosos. Además, las células lisogénicas son inmunes a la superinfección por el tipo de virus que hospedan como profago. El estado físico del profago no es idéntico para todos los virus temperantes. Por ejemplo, el profago del bacteriófago λ en *E. coli* está integrado en un sitio específico dentro del cromosoma bacteriano y se replica junto a él; mientras que el profago del bacteriófago P1 de *E. coli* se replica como un plásmido extracromosómico.

Algunos fagos temperantes contienen genes para características bacterianas que no están relacionadas con el desarrollo de fagos líticos o estado lisogénico, y la expresión de tales genes se denomina *fago conversión* (o conversión lisogénica). Ejemplos de fago conversión que son importantes para la virulencia microbiana incluyen: la producción de la toxina diftérica por *Corynebacterium diphtheriae*, la toxina eritrogénica por *Streptococcus pyogenes* (estreptococo β hemolítico del grupo A), la toxina botulínica por *Clostridium*

botulinum y toxinas similares a la de Shiga por *E. coli*. En cada uno de estos ejemplos, el gen que codifica la toxina bacteriana está presente en el genoma del fago temperante. La especificidad de los antígenos O en *Salmonella* puede, además, estar controlada por fago conversión. La fagotipia es un método particular de medir la susceptibilidad de cepas bacterianas a bacteriófagos específicos. Los patrones de susceptibilidad a un grupo de fagos proporciona información acerca de la posible relación de aislamientos clínicos individuales. Esta información es particularmente útil en investigaciones epidemiológicas.

EXPRESIÓN DEL GEN

La información genética codificada en el ADN es expresada por la síntesis de ARNs específico y proteínas, y la información fluye desde el ADN al ARN a la proteína. La síntesis del ARN dirigido por el ADN se llama *transcripción*. Ya que las bandas de doble hélice del ADN son antiparalelas y complementarias, sólo una de las dos bandas puede servir como molde para la síntesis de una molécula específica de ARN mensajero. Los ARN mensajeros (mARNs) transmiten información desde el ADN y cada ARN mensajero funciona como un molde para la síntesis de una o más proteínas específicas. El proceso por el cual la secuencia de nucleótidos de una molécula de ARN mensajero determina la secuencia primaria de los aminoácidos de una proteína se llama *traslación*. Los ribosomas, complejo de ARNs ribosomal (rARNs) y diferentes proteínas ribosómicas, trasladan cada ARN mensajero en la secuencia polipeptídica correspondiente con la ayuda del ARN específico de transferencia (tARNs), las sintetetas aminoácidas de transferencia y factores de iniciación y de elongación.

La expresión de los determinantes genéticos en las bacterias involucran un flujo unidireccional de información desde el ADN hasta el ARN a la proteína. En los bacteriófagos tanto el ADN como el ARN pueden servir como material genético. Durante la infección de la bacteria por bacteriófagos ARN, las moléculas ARN sirven como molde para la replicación del ARN y como ARN específico mensajero. Estudios realizados con retrovirus, grupo de virus animal, revela que la molécula de ADN puede ser sintetizada a partir del molde ARN por enzimas designadas como polimerasa del ADN dependiente del ARN (transcriptasa inversa). Esta reversión de la dirección usual del flujo de la información genética, desde el ARN al ADN en lugar del ADN al ARN, es un mecanismo importante para facilitar la información de los retrovirus para ser codificada en el ADN y volverse incorporado dentro de los genomas de las células animales.

REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL GEN

Las propiedades fenotípicas de las bacterias están determinadas por sus genotipos y sus condiciones de crecimiento. Para las bacterias en cultivo puro, los cambios en las condiciones de crecimiento a menudo resultan en adaptaciones fisiológicas predecibles en todos los miembros de la población. Típicamente, los productos esenciales del gen son elaborados en cantidades que permiten el crecimiento más rápido en un ambiente dado, mientras que los productos necesarios en circunstancias especiales son elaborados solamente cuando se requieran.

Las adaptaciones fisiológicas se asocian casi siempre con cambios en las actividades metabólicas. El flujo de metabolitos a través de vías bioquímicas particulares puede ser controlado, tanto por la regulación de la síntesis de enzimas específicas, como por la alteración de las actividades de las enzimas existentes.

La regulación específica implica a un gen o grupo de genes involucrados en un proceso metabólico particular. La inducción y la represión le facilita a las bacterias controlar la producción de productos específicos del gen en respuesta a signos apropiados. Generalmente las enzimas catabólicas son inducidas cuando el sustrato para una vía determinada está presente en el medio de crecimiento obtenido, mientras que las enzimas biosintéticas son reprimidas. Las enzimas que participan en una única vía bioquímica, a menudo ocupan posiciones adyacentes sobre el cromosoma bacteriano y son inducidas o reprimidas de forma coordinada. Ellas forman un *operón*, un grupo de genes contiguos que son transcritos como una unidad única y trasladados para producir los correspondientes productos del gen.

La organización dentro de un operón es una estrategia importante para la regulación coordinada de la expresión de los genes en las bacterias. Los operones que pueden ser inducidos o reprimidos son controlados por la unión de proteínas regulatorias específicas con secuencias particulares de nucleótidos que funcionan como sitios regulatorios en el operón. La comparación de las secuencias de aminoácidos de muchas de esas proteínas regulatorias diferentes, mostró que pueden ser agrupadas juntas en familias de reguladores (ejemplo: la familia de proteínas *lysR*) que quizá se han desarrollado a partir de genes antepasados comunes. Los miembros de la familia *lysR* incluyen reguladores de fenómenos diversos, tales como: el metabolismo de la lisina, la cisteína y la metionina en *E. Coli*, y la represión del hierro en *V. cholerae*.

Simultáneamente, la regulación global altera la expresión de un grupo de genes y operones, llamados colectivamente un *regulón*, que están controlados por el mismo signo regulatorio. La regulación global determina la respuesta de la bacteria a nutrientes básicos, como son: carbón, nitrógeno o fosfato, reacciones de tensión, tales como el daño del ADN o choque térmico y síntesis de factores de virulencia específicos por los patógenos, durante el crecimiento en sus animales hospederos.

La cantidad de una proteína específica en una célula bacteriana puede variar desde ninguna hasta miles de moléculas. Este amplio rango está determinado, a menudo, por la acción combinada de diferentes mecanismos regulatorios que afectan la expresión del gen estructural correspondiente. La regulación es alcanzada determinando con qué frecuencia un gen es transcrito a un ARN mensajero funcional, con qué eficiencia el ARN mensajero es trasladado a una proteína y cuán rápidamente el ARN mensajero es degradado, cuán rápidamente la proteína se transfiere, y si la actividad de la proteína puede ser alterada por efectos alostéricos o modificaciones covalentes.

MUTACIÓN Y SELECCIÓN

Las mutaciones son cambios hereditarios en el genoma. Las mutaciones espontáneas en las bacterias individuales son raras y, por lo general, ocurren con una frecuencia de 10^{-8} a 10^{-6} . Algunas mutaciones causan cambios en las características fenotípicas; la ocurrencia de tales mutaciones puede ser inferida de los efectos que ellas producen. En genética microbiana los organismos de referencia específicos son designados como cepas tipo salvaje, y las descendientes que tienen mutaciones en sus genomas se llaman *mutantes*. Por lo tanto, las mutantes están caracterizadas por las diferencias heredadas entre ellas y sus cepas tipo salvaje progenitoras.

Las mutaciones pueden ocurrir por sustituciones, supresiones, inserciones y reordenamientos de bases. Las sustituciones de bases pueden ser causadas por apareamiento erróneo entre bases complementarias durante la replicación.

Muchas sustituciones de bases escapan a la detección a nivel fenotípico, debido a que no alteran en forma significativa la función del producto genético. Por ejemplo, las mutaciones que sustituyen un aminoácido por otro, pueden ocurrir sin efecto fenotípico discernible.

Las consecuencias de las mutaciones por supresión o inserción son graves debido a que pueden alterar de modo drástico la secuencia de aminoácidos de los productos genéticos. La inserción o la supresión de un nucleótido, interrumpen el orden de traducción y, por tanto, se introduce una secuencia proteínica enteramente diferente, distal al aminoácido del codón alterado por la mutación.

Otras mutaciones pueden invertir secuencias prolongadas de ADN o transponer tales secuencias a nuevos locus. La comparación de mapas genéticos de cepas bacterianas relacionadas, ha mostrado que tales reordenamientos pueden ser constantes en las poblaciones naturales.

DETECCIÓN DE MUTANTES FENOTÍPICAS

Los medios de cultivo diferenciales y selectivos son útiles para el aislamiento de mutantes bacterianas. Algunos medios selectivos permiten el crecimiento de mutantes particulares, pero no dejan crecer a cepas tipo salvaje. Las mutantes raras pueden ser aisladas usando

tales medios selectivos. Los medios diferenciales le permiten a las bacterias mutantes y tipo salvaje crecer y formar colonias que difieren en apariencia. La detección de mutantes raras sobre medios diferenciales está limitada por el número total de colonias que pueden ser observadas.

Las mutaciones que inactivan genes esenciales en organismos haploides son, por lo común, letales; pero tales mutaciones potencialmente letales pueden, a menudo, ser estudiadas si su expresión está controlada por manipulación de las condiciones experimentales. Por ejemplo, una mutación que incrementa la termolabilidad de un producto esencial del gen puede prevenir el crecimiento bacteriano a 42 °C, aunque la bacteria mutante pueda todavía crecer a 25 °C. Inversamente, las mutantes sensibles al frío expresan el fenotipo mutante a bajas temperaturas, pero no a altas temperaturas. Las mutaciones sensibles a la temperatura y sensibles al frío son ejemplos de mutaciones condicionales. Una condicional fenotípica letal indica que el gen mutante es esencial para la viabilidad.

MUTACIONES ESPONTÁNEAS E INDUCIDAS

La proporción de mutaciones en las bacterias está determinada por la exactitud de la replicación del ADN, la ocurrencia de daño del ADN y la efectividad de los mecanismos para reparar el ADN dañado.

Para una cepa bacteriana particular bajo condiciones de crecimiento definidas, la proporción de mutaciones para cualquier gen específico es constante y está expresada como la probabilidad de mutación por división celular. En una población de bacterias desarrolladas a partir de un pequeño inóculo, la proporción de mutantes y el tamaño de la población bacteriana aumentan progresivamente. Las mutaciones en las bacterias pueden ocurrir espontánea e independientemente de los métodos experimentales usados para detectarlas.

Los factores ambientales y genéticos afectan la proporción de mutaciones. La exposición de bacterias a agentes mutagénicos causa una proporción de mutaciones que se incrementa, en ocasiones, a diferentes órdenes de magnitud. Muchos agentes físicos y químicos, incluyendo los rayos X y la luz ultravioleta, tienen actividad mutagénica. Los agentes químicos que son carcinogénicos para los animales, con frecuencia son mutagénicos para las bacterias, o pueden ser convertidos por los tejidos animales en metabolitos que son mutagénicos para las bacterias. Las pruebas estandarizadas para detectar mutagenicidad en las bacterias son usadas como procedimientos de selección para identificar agentes ambientales que pueden ser carcinogénicos para los humanos.

La mayoría de las mutaciones son dañinas, y el riesgo de mutaciones adversas para las bacterias individuales debe ser balanceado contra el valor positivo de mutabilidad como un mecanismo para la adaptación de las poblaciones bacterianas a las condiciones ambientales cambiantes.

BASE MOLECULAR DE LAS MUTACIONES

Las mutaciones son clasificadas sobre la base de los cambios estructurales que ocurren en el ADN. Algunas mutaciones están localizadas en segmentos cortos del ADN (por ejemplo, sustituciones de nucleótidos, microsupresiones y microinserciones). Otras mutaciones involucran regiones grandes del ADN e incluyen supresiones, inserciones o reordenamientos de segmentos del ADN.

PRUEBAS DE COMPLEMENTACIÓN

Para determinar si las mutaciones están localizadas en el mismo gen o en genes diferentes, se llevan a cabo las pruebas de complementación con cepas bacterianas parcialmente diploides. Estas pruebas fueron originalmente llamadas pruebas "cis-trans", y el término cistrón es empleado algunas veces como sinónimo de gen. Las pruebas de complementación pueden llevarse a cabo e interpretarse aunque las funciones bioquímicas específicas de los productos del gen sean desconocidos.

REVERSIÓN Y SUPRESIÓN

La recuperación de una actividad perdida como consecuencia de una mutación se denomina *reversión fenotípica*, lo cual puede resultar o no de la restitución de la secuencia original del ADN (*reversión genotípica*).

Las mutaciones supresoras son aquellas que no restauran la secuencia exacta de nucleótidos y pueden ser intragénicas o extragénicas. En la *supresión intragénica*, después que una mutación primaria ha cambiado la estructura de una enzima, de modo que su actividad se ha perdido, una segunda mutación, en un sitio diferente en el gen de la enzima, restablece la estructura requerida para la actividad. La *supresión extragénica* es causada por una segunda mutación que ocurre fuera del gen afectado en un principio.

Algunos supresores extragénicos son específicos para genes particulares, otros son específicos para codones y algunos tienen otros patrones de especificidad. Los supresores extragénicos que revierten los efectos fenotípicos de los codones en la cadena terminal han sido bien caracterizados y se ha encontrado que alteran la estructura del ARN de transferencia.

RECOMBINACIÓN DE LAS BACTERIAS

Se define por recombinación al proceso en que tenga lugar la formación de un nuevo ADN a partir de moléculas destruidas, de manera que la información genética procedente de cada molécula de ADN original estará presente en las nuevas. Es un proceso celular esencial, catalizado por enzimas que la célula codifica y regula con un propósito.

La recombinación constituye:

1. Fuente de variabilidad genética.
2. Intercambio físico de segmentos.
3. Valor regulatorio: puede tener como resultado la activación o inactivación de los genes.
4. Una vía de reparación.

En el caso de las bacterias son tres los procesos conocidos que conducen a la formación de un nuevo ADN. En orden cronológico de su descubrimiento, estos procesos son:

1. Transformación.
2. Conjugación.
3. Transducción.

En los organismos eucarióticos, la célula diploide formada por la fusión de dos células sensibles haploides (gametos) se denomina *cigoto*. En las bacterias pueden formarse también cigotos, sólo que no existe fusión de células sin transferencia de parte del material genético de una célula donadora a otra aceptora, aportándole a esta última un estado diploide parcial (formación de un gameto parcial denominado *merocigoto*).

El genoma original de la célula receptora se conoce como *endogenote* y el fragmento de ADN introducido en ella, *exogenote*. El exogenote y endogenote generalmente se aparean (mecanismo parasexual) y recombinan de inmediato después de la transferencia, formándose un ADN recombinante por la integración parcial o total del exogenote; si esto no ocurriera, el exogenote puede persistir y replicarse si dispone de los elementos genéticos necesarios para su propia replicación, de manera que los merocigotos den lugar a un clon de células parcialmente diploides; si carece de esos elementos, persiste, pero no se replica; este fenómeno se ha observado solamente en la transducción y se conoce con el nombre de *transducción abortiva*. Finalmente, el exogenote puede ser degradado por procesos enzimáticos (restricción del hospedador) (Fig. 8.3).

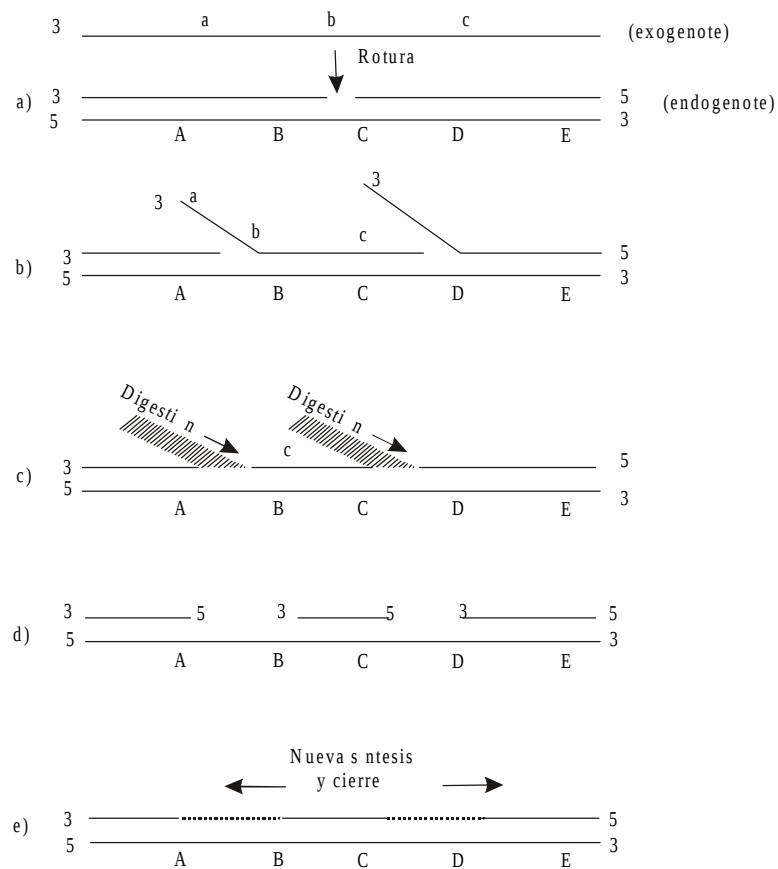


Fig. 8.3. Integración de un exogenote unicatenario o un endogenote bicatenario (ABCDE). a) rotura; b) apareamiento; c) y d) digestión de los extremos por exonucleasas; e) síntesis por polimerasas y cierre por polinucleótido ligasa con formación de una molécula recombinante (ABCDE).

RESTRICCIÓN Y MODIFICACIÓN

La restricción fue descubierta en infecciones bacteriofágicas de *E. coli* K12 y *E. coli* cepa B. La partícula fágica que infecta a la primera y establece una infección productiva, lo hace porque su ADN se ha producido en ese tipo de células. Si ese primer fago infecta a la segunda, el ADN de este resulta extraño y no se produce la infección productiva; ello se debe a la existencia en la célula hospedera de una endonucleasa específica que degrada al ADN extraño. El fenómeno se conoce como *restricción* y la endonucleasa como *enzima de restricción*. Por lo tanto inferimos que el ADN fágico producido en una célula determinada deja de ser un sustrato para la enzima de restricción, es modificado enzimáticamente y queda protegido contra la restricción. La *modificación* es un proceso de metilación de bases en sitios altamente específicos del ADN y que constituyen los puntos de ataque de la enzima de restricción.

INTEGRACIÓN DEL EXOGENOTE Y EL ENDOGENOTE

La recombinación entre exogenote y endogenote ocurre por un proceso de rotura y reunión de las moléculas del ADN paternas. Lo más importante de este proceso, y esencial para su éxito, es la conservación de la secuencia de pares de bases.

TRANSFORMACIÓN

La transformación genética es la transferencia de un fragmento de ADN de un genoma donador a través de la membrana celular receptora y la incorporación de este fragmento en el genoma de esta célula. Puede ser:

1. *Homóloga*: transferencia o transformación de material genético de la misma especie.

2. *Heteróloga*: transferencia o transformación de material genético en especies diferentes.
3. *Horizontal*: transformación heteróloga que ocurre en ambientes naturales.

Este mecanismo de recombinación genética fue descubierto en el *Streptococcus pneumoniae*. Este microorganismo produce colonias lisas (L) (capsuladas y virulentas) que en repetidos subcultivos se tornan rugosas (R) (no capsuladas y no virulentas). Griffith, en 1928, observó que cuando se inoculaban a un ratón células R provenientes de un cultivo liso tipo I junto con células L provenientes de un cultivo tipo II y muertas por el calor, el ratón moría en pocos días y de la sangre de los mismos sólo se podía aislar células lisas tipo II. Se comprobó también que esa propiedad transferida era hereditaria y se denominó *principio transformador*, que en 1944 fue identificado como ADN por O.T. Avery y otros.

El factor limitante en la producción de transformantes es la competencia de la población celular receptora para incorporar ADN transformante.

Estado de competencia natural. Es el estado donde la célula tiene la habilidad de unir e internalizar ADN exógeno.

Factores críticos que determinan la frecuencia de transformación

1. Tamaño de los fragmentos de ADN.
2. Estado fisiológico de la bacteria receptora.
3. Concentración de ADN.

Se conoce que las células competentes producen una proteína susceptible de ser aislada del medio y utilizada para conferir competencia a otras células, y pudiera ser un componente de la membrana que cataliza la incorporación del ADN a una enzima que degrada algún componente de la superficie celular desenmascarando el receptor para el ADN.

Este mecanismo de recombinación ha sido estudiado en: *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria* spp., *Bacillus* spp. y *Escherichia coli* (con altas concentraciones de ion calcio), en los cuales el estado de competencia es regulado en respuesta a señales célula-célula y(o) condiciones nutricionales.

Barreras naturales que inciden en la transformación

1. Sistemas de metilación (modificación)-restricción de células.
2. Superficie celular.
3. Condiciones ambientales.

Existen evidencias experimentales de que tanto el ADN cromosomal como el plasmídico están sujetos a intercambio genético mediante la transformación, y existen estudios desde 1989, basados en la hipótesis de que la transformación puede ser un poderoso mecanismo de transferencia horizontal de genes dentro de las poblaciones naturales y en la especiación y evolución bacteriana.

CONJUGACIÓN

Es la transferencia de material genético en una sola dirección. Implica la unión de dos estirpes bacterianas diferenciadas sexualmente. El elemento genético que dirige la propiedad hereditaria de ser donador se denomina *factor* o *plásmido F* (de fertilidad). La transferencia del genoma bacteriano es una consecuencia secundaria de la transferencia plasmídica y depende de la integración del genoma y el plásmido en la célula donadora.

Plásmidos

Elementos genéticos (ADN) extracromosómicos, circulares, de doble cadena, con peso molecular entre 3×10^6 y 1×10^8 . Pueden contener hasta 100 genes. El contenido en G + C fluctúa entre 44 y 50 %.

Se replican siempre que se encuentren en su forma circular, son sensibles a los colorantes de acridina y a la luz ultravioleta.

Proceso de la conjugación

El proceso de conjugar y transferir una molécula de ADN plasmídico a su pareja de conjugación ocurre en dos etapas:

1. Formación de un puente de conjugación.
2. Paso del ADN plasmídico a través del puente.

Ello se debe a la presencia de unos apéndices especiales llamados *fimbrias conjugativas* (o sexuales) en las células donadoras y a receptores específicos en las receptoras. El paso intercelular de ADN es muy específico y la transferencia de otro material es escasa o nula.

El contacto entre la fimbria de conjugación y el receptor pone en marcha el proceso. Se rompe una cadena de ADN plasmídico y penetra en la cadena receptora, la ADN polimerasa sintetiza una réplica del mismo en la receptora, mientras que la otra permanece en la donadora; a partir de este momento, la cepa receptora adquiere la capacidad de donar el ADN.

Las células que albergan un plásmido F se denominan F^+ y F^- a las que carecen de él. Cuando este plásmido se integra al genoma bacteriano, los clones sucesivos son denominados HFr (alta frecuencia de recombinación); este último proceso es reversible.

Cuando se mezclan células HFr con F^- ocurre transferencia de ADN, pero esta vez, como el plásmido y el genoma están unidos (un solo replicón), a la célula receptora pasa el ADN del plásmido y del genoma celular. Los marcadores del genoma transferidos están en dependencia del sitio de inserción del plásmido en el mismo.

La célula que recibe un plásmido con segmento de ADN genómico se denomina F' y si incluye genes de funciones indispensables, su pérdida produce muerte celular (Figs. 8.4 y 8.5).

Principales grupos de plásmidos

1. Plásmidos R: comprende dos segmentos:
 - a) Factor de transferencia de resistencia.
 - b) Determinantes de resistencia.
 Confieren resistencia a diferentes agentes antimicrobianos.
 - Factores colicinogénicos: genes que ordenan la síntesis de colicinas; toxinas letales para las bacterias coliformes.
 - Factores sexuales: son los mediadores de la transferencia, el más estudiado es el F.
 - Plásmidos penicilinas de *Staphylococcus aureus*: poseen genes que implican la producción de una penicilinas potente que provoca resistencia a las penicilinas. Difieren de los R en que no se transfieren por conjugación, sino por transducción mediada por fagos.
 - Plásmidos degradantes de *Pseudomonas*: genes plasmídicos los cuales ordenan la síntesis de enzimas que actúan sobre alguna ruta metabólica especial utilizada por estos microorganismos; ejemplos: plásmido del alcanfor, octano, salicilato; son transferibles entre especies de *Pseudomonas* por conjugación.
 - Plásmidos ocultos: moléculas circulares de ADN presentes en casi todas las especies bacterianas que no llevan genes que puedan ser detectados, por ahora, fenotípicamente.

Conjugación en los diferentes grupos bacterianos

Se ha observado este proceso en:

Bacterias gramnegativas: *E. coli*, *Shigella* spp., *Salmonella* spp., *Proteus* spp. y *Pseudomonas aeruginosa*.

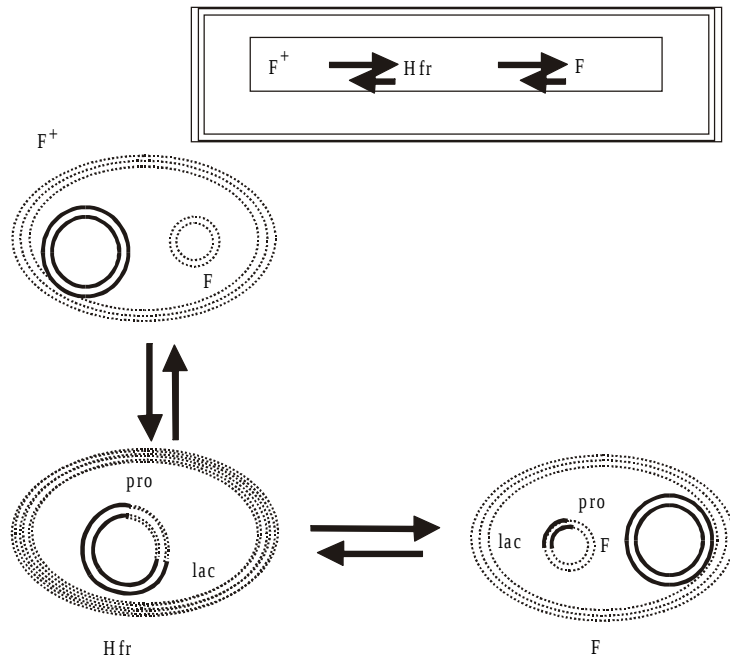
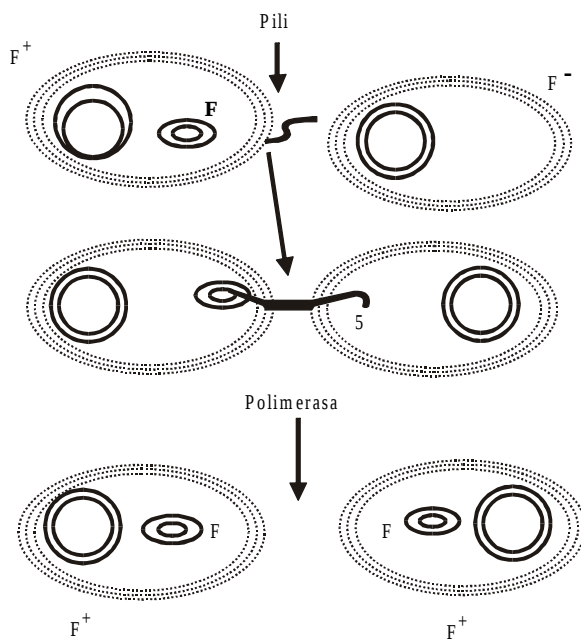


Fig. 8.4. Conjugación: formación de una célula Hfr y F' a partir de una célula F⁺.



Bacterias grampositivas: miembros del género *Streptomyces*.

Fig. 8.5. Recombinación en bacterias: mecanismo de conjugación.

Aplicaciones prácticas de la conjugación

1. Construcción de cepas mutantes.
2. Mapeo de mutaciones.

3. Localización de genes.
4. Estudio de evolución genética: relación filogenética entre especies microbianas.
5. Estudios poblacionales: relaciones entre los microorganismos de diferentes especies en ambientes naturales.

TRANSDUCCIÓN

Es el mecanismo genético mediante el cual un fragmento del genoma bacteriano se incorpora a un virión en formación (fago temperante), de manera que cuando esta partícula viral infecta a otra célula, le inoculara parte del material genético del hospedero anterior.

Tipos de transducción

1. *Generalizada*: es aquella en que cualquiera de los genes del genoma bacteriano tiene probabilidades de ser transportado por el fago.
2. *Restringida*: sólo se incorporan los genes contiguos al lugar de inserción del profago.
Fago temperante: es aquel bacteriófago que habitualmente no realiza un ciclo lítico, se reproduce en sincronía con el hospedero y produce clones celulares infectados. Este estado conferido a una célula se denomina lisogenia y el genoma viral presente en ellas se denomina profago.
3. *De alta frecuencia*: ocurre cuando la célula recibe un fago restringido y uno normal, de manera que el resultado de la maduración de ambos determina que el 50 % sea capaz de transducir una propiedad genética.
4. *Abortiva*: tiene lugar cuando existe un fracaso en la integración del exogenote al genoma bacteriano, este persiste pero sin replicarse, de manera que sólo una de las células hijas lo recibe.

En la transducción abortiva de una bacteria *his* (-) por un gen *his* (+), el exogenote *his* (+) produce enzimas para la síntesis de la histidina. Si sembramos esta bacteria en un medio carente de histidina, el cigote crece y se divide, pero el exogenote no se replica, por lo que una de las hijas no recibirá el gen *his* (+) y continuará dividiéndose mientras le queden enzimas; en cambio, la otra que sí recibe el *his* (+) seguirá fabricando enzimas; en la siguiente división ocurre el mismo fenómeno. El resultado es la formación de colonias diminutas de crecimiento lento por las *his* (-) y colonias grandes por las *his* (+), las primeras son representativas de una transducción abortiva (Fig. 8.6).

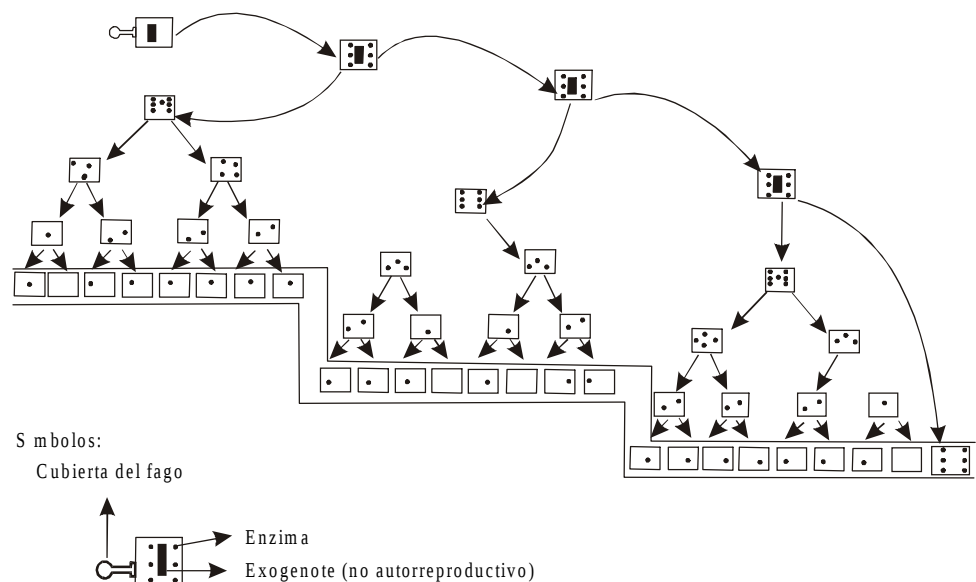


Fig. 8.6. Transducción abortiva: en cada división, sólo una de las células recibe el gen activo. La otra continúa en unas cuantas divisiones celulares hasta que el producto de gen activo (por ejemplo, enzima) es diluido. La siembra de un gen transductante abortivo produce una colonia diminuta, en la cual solamente una célula es capaz de ulterior crecimiento y división. Tomado de: Jawetz E y cols. Manual de Microbiología Médica 14ta ed., 1981.

Conversión fágica. Propiedades importantes de muchas bacterias son reguladas por genes fágicos y se manifiestan en aquellas que se encuentran en estado de lisogenia o infectados por estos fagos, a esto se denomina conversión fágica; ejemplo: producción de toxinas por el *Corynebacterium diphtheriae*, presencia de ciertos componentes antigénicos de la pared de *Salmonella*. Las partículas fágicas que determinan la conversión son defectivas por haber perdido algunos genes propios del fago debido al intercambio génico. La conversión fágica y la transducción de alta frecuencia son semejantes.

La transducción puede observarse en: enterobacterias, *Pseudomonas* spp., *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* y *Bacillus*.

Recombinación en virus bacterianos. Una célula bacteriana puede ser infectada por dos fagos diferentes muy relacionados y que difieran en varios marcadores genéticos. Al finalizar el proceso encontraremos fagos idénticos a los paternos y diversos tipos de recombinación genética.

FUNDAMENTO DE LA INGENIERÍA GENÉTICA

La recombinación de fragmentos de ADN ocurridos por transformación, conjugación o transducción, exige homología de las secuencias entre las bases que conforman las zonas que van a ser intercambiadas, para asegurar que la molécula resultante no se vea alterada. El uso de marcadores detecta la recombinación al ser sustituido un gen salvaje por un mutante o viceversa.

Este intercambio de zonas de ADN homólogas está catalizado por enzimas que dependen del gen Rec A, por ello, aunque es posible el intercambio de genes de forma mecánica por conjugación o transformación en microorganismos de diferentes especies, la aparición de recombinantes sólo ocurre entre donadores y receptores homoespecíficos, es decir, entre organismos relacionados, con la excepción de plásmidos o bacteriófagos integrados a un genoma heteroespecífico.

Artificialmente, tras el descubrimiento de las desoxiendonucleasas de restricción y el amplio desarrollo de la tecnología bioquímica, se llevó a cabo la recombinación *in vitro* de moléculas de ADN no homólogas, procedentes de microorganismos alejados filogenéticamente, incluso entre procariotas y eucariotas o sintetizados de forma artificial.

Todo esto ha traído como consecuencia la creación de organismos nuevos desde el punto de vista genético y que conservan las características propias codificadas en cada región provenientes de sus ADN integrantes.

Esta tecnología ha dado en llamarse ingeniería genética o ADN recombinante, ofreciendo perspectivas muy prometedoras en el campo de la industria y de la terapéutica.

El rápido avance de la tecnología del ADN recombinante se ha debido con mucho al empleo de las enzimas de restricción; ellas son las responsables de la degradación del ADN extraño que penetra. Se conocen varios tipos de las mismas; señalaremos algunas:

1. *Tipo I*: producen ruptura endonucleolítica en lugares indiscriminados de la doble cadena de ADN.
2. *Tipo II*: producen roturas en lugares específicos con secuencias concretas de 4-6 pares de nucleótidos. Su especificidad es muy elevada y la digestión del ADN por ella permite prever a priori el número y tipo de fragmentos que se van a obtener.

Cada especie bacteriana, e incluso cada cepa, tiene su sistema de restricción particular y con especificaciones diferentes a las de otras cepas.

El cortar moléculas en sitios específicos del ADN y poder unirlos a otros, permite seleccionar genes aislados con propiedades que pueden resultar muy interesantes, ya que permitirá destacar una característica específica que se encontraba dispersa en organismos distintos.

Las técnicas de ADN recombinante permiten seleccionar la región del ADN que contenga un gen del cual se desee estudiar su secuencia o producto proteico elaborado y construir un híbrido con un sistema génico que confiera capacidad de replicación y estabilidad al conjunto en el interior de una célula viva. La obtención de un gran número de copias de una

determinada región del ADN a partir de una copia original se denomina *clonación molecular*, y los genes utilizados para transportar el fragmento a clonar son llamados *vectores*.

Los vectores más utilizados son los virus y los plásmidos, fundamentalmente los últimos por su capacidad de ser transmitidos por transformación, ser replicones autónomos, muy estables y ser amplificables por antibióticos como el cloranfenicol.

De forma general, la molécula recombinante entre el vector y el ADN pasajero (fragmento obtenido por digestión del genoma en el cual se encontraba anteriormente), se construye aislando el ADN pasajero en geles de agarosa y combinándolo *in vitro* con el vector previamente purificado y linearizado por enzimas de restricción. Esta molécula recombinante es seleccionada después en geles de agarosa para verificar la correcta unión y finalmente es introducida en la célula receptora por transformación.

PERSPECTIVAS DEL USO DE ADN RECOMBINANTE

1. Permite conocer los sistemas de regulación, secuencias y regiones clonadas en los genes.
2. Obtención de proteínas biológicas con propiedades específicas a una alta concentración y bajo costo.
3. Obtención de antígenos víricos o bacterianos para elaborar vacunas, enzimas, hormonas, etcétera, en grandes cantidades mediante cultivos industriales.
4. Introducir en organismos superiores genes que aportarán características que hasta ahora faltaban, como: supresión de anomalías genéticas en mamíferos, fijación del nitrógeno por plantas que adolecían de esta característica, y otras.

RESUMEN

Se presenta una introducción al tema definiendo los conceptos de genética, genotipo y fenotipo. Se describe la estructura del ácido nucleico, tanto del ADN como del ARN; así como las características más importantes y distintivas entre los genomas eucariótico, procariótico y viral.

Se brindan algunos detalles de la replicación del ADN eucariótico y bacteriano. Además, se describen los aspectos más sobresalientes relativos a los transposones, los plásmidos y los bacteriófagos.

Teniendo en cuenta que la expresión del gen es una función esencial del material genético, se aborda en síntesis cómo la información genética codificada en el ADN se expresa normalmente y cómo ocurre su regulación.

Las mutaciones son cambios hereditarios en el genoma y aunque en las bacterias son raras las mutaciones espontáneas, se explican algunos aspectos generales.

La transferencia de material genético en las bacterias se conoce como recombinación, proceso en el que coexisten una célula donadora (F^+) y una aceptora (F^-), la cual adquiere características nuevas provenientes de la primera. Los mecanismos de recombinación son tres:

1. Transformación.
2. Conjugación (mediada por plásmidos).
3. Transducción (mediada por fagos).

Se explican los tres mecanismos y los microorganismos en los cuales ocurre cada uno de ellos. Se detalla el concepto, características y tipo de plásmidos que se conocen en la actualidad y los fundamentos de la ingeniería genética (ADN recombinante).

BIBLIOGRAFÍA

- Finlay BB, Falcow S. Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 1997; 61(2):139.
- Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA. *Microbiología médica de Jawetz, Melnick y Adelberg*. 15ta ed. México D.F.: Ed. El manual Moderno, 1996.
- Stanier RY, Adelberg EA, Ingraham JL. *Microbiología*. 4ta ed. Barcelona: Editorial Reverté SA, 1984.
- Strom MS, Lory S. Structure-function and biogenesis of the type IV pili. *Annu Rev Microbiol* 1993; 47:565-96.