

GENÉTICA BACTERIANA

ÍNDICE

TEMA	PÁGINA
I. INTRODUCCIÓN.	1
II. ANTECEDENTES.	2
1. CROMOSOMA BACTERIANO.	2
1.1. Composición química.	3
1.1.1. Nucleótidos.	4
1.1.2. Bases purinas y pirimidinas.	4
1.1.3. Enlaces.	5
1.2. Conformación.	5
1.3. Función.	5
2. DUPLICACIÓN DE ADN (ÁCIDO DESOXIRIBONUCLEICO)	6
2.1. Semiconservativa.	6
2.2. Circular.	6
2.3. Procesos de duplicación.	8
2.3.1. Iniciación.	11
2.3.1.1. Ori "T".	12
2.3.1.2. Proteína ADN "B".	12
2.3.1.3. Proteína ADN "G".	13
2.3.1.4. Primosoma.	14
2.3.1.5. ADN Polimerasas (I, II, III).	14
2.4. Elongación del cromosoma.	17
2.4.1. Fragmentos de Okasaki.	18
2.5. Corrección de la duplicación.	19
3. ARN (ÁCIDO RIBONUCLEICO).	21
3.1. Composición química.	21
3.2. Conformación.	21
3.3. Tipos.	21
3.3.1. ARN pequeño heterogéneo.	24
3.3.2. ARN mensajero.	25
3.3.3. ARN transferencia.	25
3.3.4. ARN ribosomal.	26

4. RECOMBINACIÓN GENÉTICA.	27
4.1. Transformación.	27
4.2. Transducción.	33
4.2.1. Generalizada.	33
4.2.2. Especializada.	36
4.3. Transposicional.	41
4.3.1. Transposón (TN).	41
5. CONJUGACIÓN.	43
5.1. Tipos celulares.	48
5.1.1. Célula F ⁺ .	49
5.1.2. Célula F ⁻ .	49
5.1.3. Célula Hfr.	49
5.1.4. Célula F'.	49
5.2. Plásmido F.	50
5.2.1. Composición.	50
5.2.2. Función.	51
5.2.3. Tipos de Plásmidos.	51
5.2.4. Proteína SSB.	52
5.2.5. Sistema del Operón.	53
6. MUTACIÓN.	56
6.1. Variaciones de la mutación.	57
6.2. Deleción.	58
6.3. Inserción.	58
6.4. Inversión.	58
6.5. Corrida de lectura ("Frameshift").	60
6.6. Traslocación o Transversión.	61
7. RESISTENCIA A LOS ANTIBACTERIANOS.	62
7.1. Plásmido "R".	62
7.2. Gen <i>Gyr A</i> .	62
7.3. Gen <i>Gyr B</i> .	63
8. INGENIERÍA GENÉTICA.	64
8.1. Usos y aplicaciones.	66
III. CONCLUSIONES.	69
IV. GLOSARIO.	70
V. BIBLIOGRAFÍA.	73

I. INTRODUCCION.

Actualmente son escasas las áreas del campo de la biología en donde no se contemple el uso de técnicas de biología molecular para diversos menesteres, los cuales van desde el diagnóstico preciso y temprano de infecciones por organismos patógenos en plantas, animales y humanos, hasta la generación de vacunas y fármacos específicos y el mejoramiento de especies por medio de ingeniería genética. Esta revisión pretende dar un panorama acerca de uno de los mecanismos más importantes dentro de las células tanto Eucariotas como Procariotas, el reconocimiento y unión de proteínas a secuencias de ADN.

La regulación de la expresión génica, la división celular y la diferenciación dentro de las células Eucariotas y Procariotas, se encuentran ligados a uno o varios de los mecanismos de empaquetamiento, replicación, recombinación, restricción y Transcripción del ADN contenido en su genoma, la importancia que tienen las interacciones de proteínas con el ADN en éstos mecanismos básicos para la vida de todos los organismos vivos, ha hecho que el entendimiento de la naturaleza de las interacciones proteína-ADN conlleve a una mejor comprensión de los procesos inherentes para su sobrevivencia, y ha permitido entre otras cosas a la generación de fármacos (ej. Antibióticos) y pruebas diagnósticas de extrema sensibilidad y especificidad como la reacción en cadena de la *Polimerasa*.

II. ANTECEDENTES

1. CROMOSOMA BACTERIANO.

Toda la información genética esencial para la vida de la célula bacteriana, está contenida en una única molécula de ADN de doble cadena, circular y covalentemente cerrado y que poseen ADN extra cromosómico.

El ADN como macromolécula, esta compuesto por 2 cadenas nucleotídicas o hebras antiparalelas, que se enlazan entre si conformando una doble hélice¹ (Fig. 1)

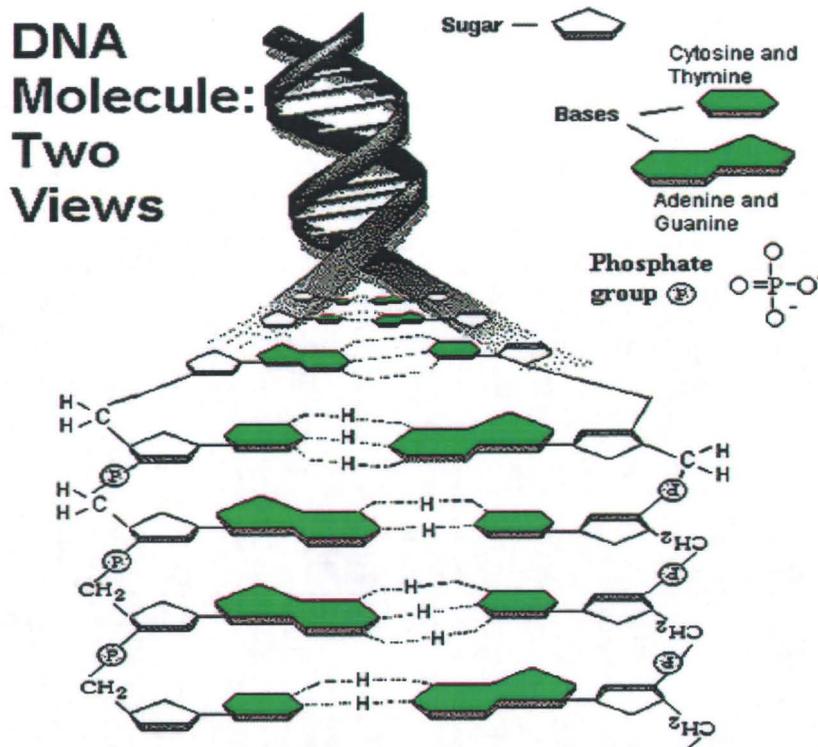


Fig. 1 Estructura del ADN en la que se observa su composición con las bases púricas y pirimídicas con los puentes de unión, el azúcar y el grupo fosfato (tomada de: <http://www.hsa.es/org/dmedica/centrales/ap/docs/biomol>)

1.1. Composición química.

Esta compuesta por 4 distintas bases nitrogenadas (átomos de carbono y nitrógeno), adenina, guanina, citosina y timina, un azúcar (2- desoxirribosa) y un grupo fosfato¹ (Fig. 1, 2 y 3).

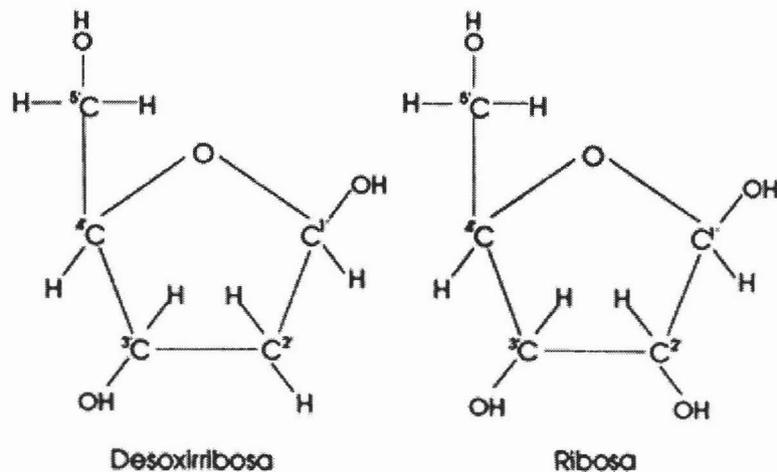


Fig. 2 Esquema que muestra la estructura de los 2 azúcares que constituyen al ADN y ARN.

(tomada de:<http://www.hsa.es/org/dmedica/centrales/ap/docs/biomol>)

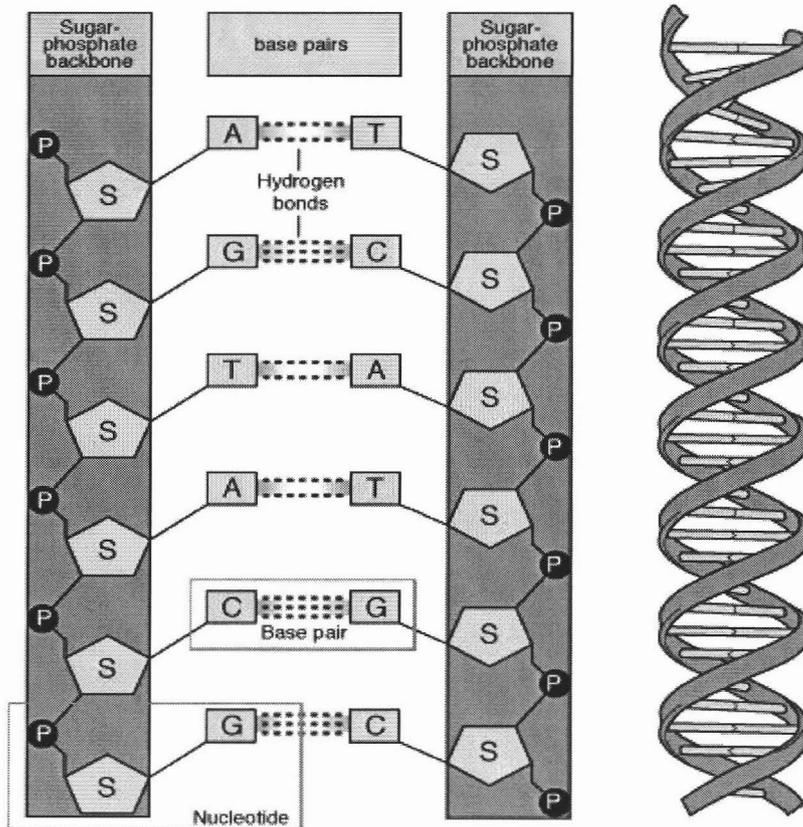


Fig. 3. Conformación estructural y hélice del ADN
(tomada de: <http://www.garlandscience.com/ecb/about.html>)

1.1.1. Nucleótidos.

Los nucleótidos están formados por la unión de bases nitrogenadas a través de puentes de hidrógeno a una glucosa y un fosfato, estos son conocidos como pares de bases (Pb), los cuales pueden utilizarse como la unidad de medida respecto al tamaño o longitud para las moléculas de ADN, y apareamiento de dos cadenas de ADN¹ (Fig. 3).

1.1.2. Bases purinas y pirimidinas.

Las bases nitrogenadas que forman el ADN son adenina (A), timina (T), citosina (C) y guanina (G), y en el caso del ARN en vez de T se encuentra

uracilo (U), A y G se denominan bases púricas o purinas, mientras que T, U, y C se denominan bases pirimidínicas o pirimidinas. De esta manera, una cadena o hebra de ácido nucleico, tendrá una estructura primaria determinada por la secuencia de las bases que la componen¹ (Fig. 1 y 3).

1.1.3. Enlaces

Los enlaces entre las dos hebras de ADN están dados por puentes de hidrógeno entre las purinas de una cadena con las pirimidinas de la otra, de esta forma, la **A** forma dos puentes de hidrógeno con la **T**, mientras que la **C** forma 3 puentes de hidrógeno con la **G**, a esto se le llama complementariedad de bases, es decir que la **A** es complementaria a la **T** y la **C** lo es a la **G**. estos enlaces permiten mantener estable la estructura de la doble hélice de ADN en la que pueden distinguirse pares de nucleótidos o mejor dicho Pb¹ (Fig. 1 y 3).

1.2. Conformación

Los ácidos nucleicos son macromoléculas compuestas de nucleótidos unidos en forma covalente por medio de enlaces fosfodiéster entre los carbonos de las posiciones 3' y 5' de dos residuos de azúcares adyacentes, que conforman un esqueleto de azúcares y fosfatos¹ (Fig. 3);).

1.3. Función

Llevar la información genética para la duplicación teniendo como resultado otra célula por fisión o la síntesis de una proteína¹

2.- DUPLICACIÓN DEL ADN (ÁCIDO DESOXIRIBO-NUCLEICO).

El ADN se copia de forma precisa durante su síntesis o duplicación, en las células de todos los organismos vivos, el ADN debe ser duplicado antes de que la célula pueda dividirse, la duplicación comienza cuando las cadenas se separan, exponiendo de esta forma su secuencia de nucleótidos, la enzima *polimerasa* del ADN se mueve a través de las dos hileras, pareando las bases complementarias a los nucleótidos expuestos, una hilera complementaria es formada para cada hilera de la doble hélice original, cada hilera original se une con su hilera complementaria para formar una molécula de ADN, resultando dos moléculas de ADN idénticas, este tipo de duplicación se llama semiconservativa, la duplicación del ADN siempre comienza en el terminal 5' y termina en el terminal 3'. Sólo una hélice tiene libre este terminal disponible y su formación es continua, la otra hélice se construye en pedazos (segmentos de Okasaki) y luego se unen por medio de la enzima *Ligasa*¹

(Fig. 4;).

2.1. Semiconservativa

Se considera replicación 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. La replicación semiconservativa del ADN genera dos moléculas idénticas¹

(Fig. 5)

2.2. Circular

En los Procariotas hay un único cromosoma con un único origen de replicación localizado dentro de una secuencia específica de nucleótidos de aproximadamente 1 mm de pares de bases, cuando las cadenas replicadas

comienzan a separarse se forma una estructura que recuerda la letra griega *theta* y finalmente se originan dos DNAs circulares, existiendo una burbuja que se expande bidireccionalmente hasta que alcanza a una nueva burbuja adyacente, y cuando estas burbujas se fusionan, todo el cromosoma ha quedado replicado¹.

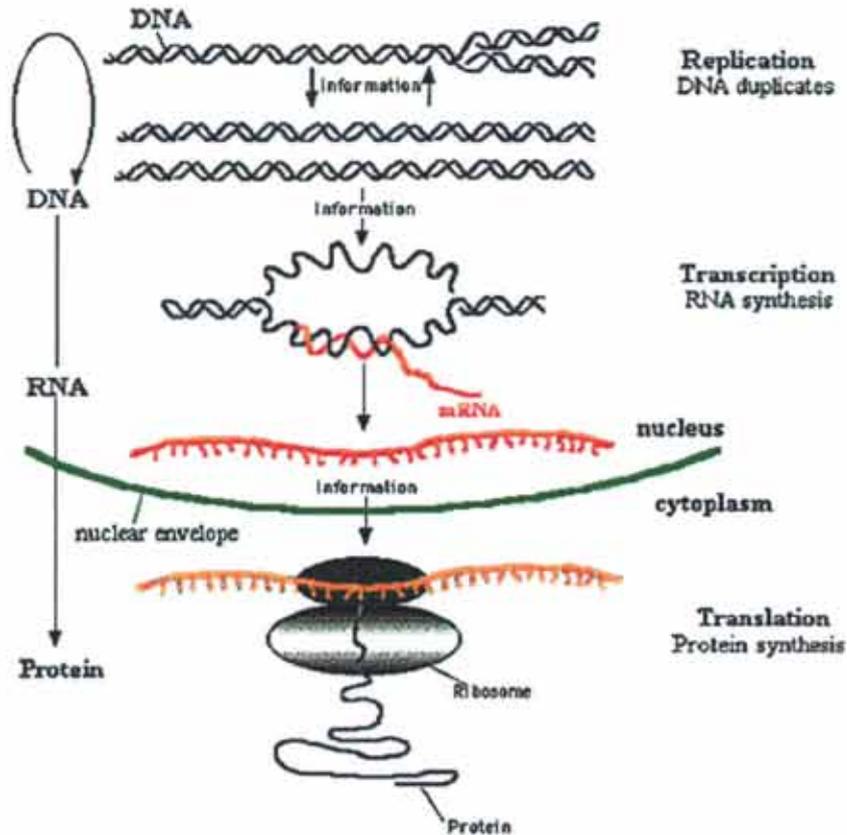


Fig. 4. Pasos de la división del ADN
(tomada de: <http://www.garlandscience.com/ecb/about.html>)

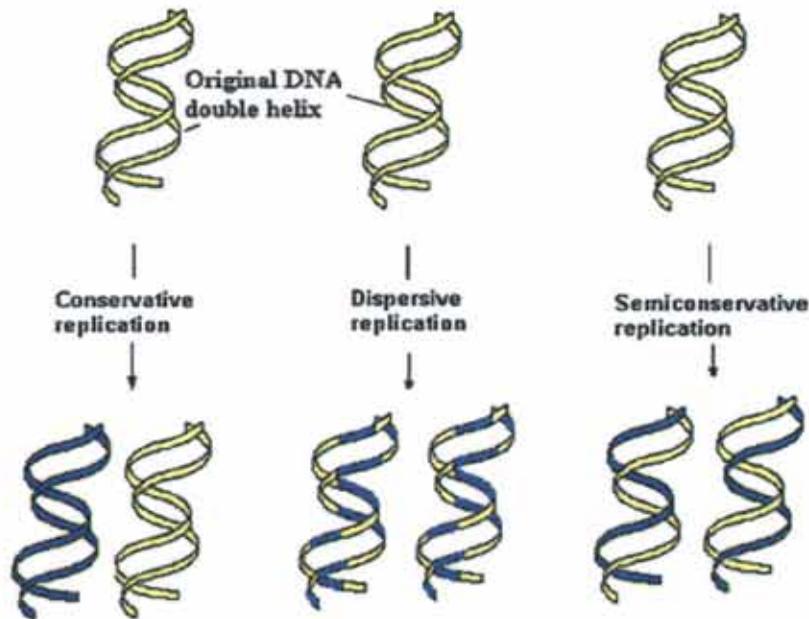


Fig. 5. Modelos que explican la división del ADN
(tomada de: <http://www.garlandscience.com/ecb/about.html>)

2.3. Procesos de duplicación.

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, el ARN *polimerasa* bacteriano, es distinta de la que tiene la célula eucariota, y de hecho, ciertos antibióticos que tienen como blanco la ARN *polimerasa* (como la Rifampicina) son efectivos exclusivamente frente a células Procariotas¹ (Fig. 6;).

La ARN *polimerasa* reconoce un sitio específico en el ADN, llamado promotor, al cual se une iniciando el proceso de la Transcripción, un mismo Transcripto que es el 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** los genes Procariotas, no poseen Intrones como los eucariotas, es decir que una vez Transcripto el ARNm, éste será traducido directamente en una secuencia polipeptídica, sin necesidad de realizar un procesamiento post-Transcricional, 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 proteica¹.

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 aminoácidos¹.

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), éstas 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 implicaciones¹.

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 las 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 regulación¹ (Fig. 7);).

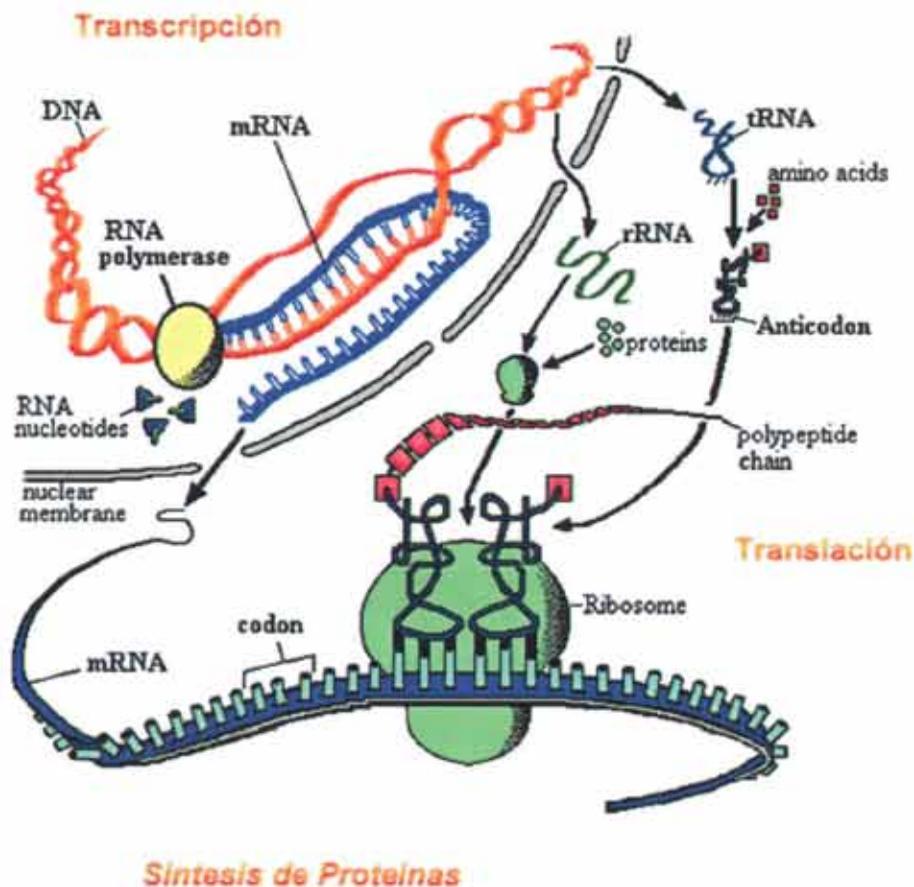


Fig. 6. Esquematiza como se realiza la síntesis de proteínas (tomada de: [http:// www.hsa.es/org/dmedica/centrales/ap/docs/biomol](http://www.hsa.es/org/dmedica/centrales/ap/docs/biomol))

2.3.1. Iniciación

En los procariontes el cromosoma circular es también como en la mayoría de las bacterias, donde existe un punto único donde comienza la síntesis de ADN, el llamado origen de replicación, este punto consiste de una secuencia específica de unas 300 bases que es reconocida por proteínas específicas, la doble hélice se abre y la iniciación comienza en las dos cadenas (horquilla de replicación), esta va avanzando en ambos sentidos a medida que transcurre la replicación cromosómica¹

2.3.1.1. ORI "T"

Es la región que contiene al *Ori t* que es el sitio en donde se inicia la transferencia de ADN y al menos 28 genes que son designados *Tra* y *Trb* esta región de 35 kb se denomina regulón *Tra*, debido a que los genes *Tram* y *Traj* forman transcritos separados mientras que los restantes genes forman un único operón, el locus (sitio en el genoma) que contiene al *Ori T* se denomina *mob* (Basis of Mobility -bases de movilidad). (<http://www.microbiología.com.ar/bacteriología/genética.php>)

2.3.1.2. Proteína ADN B (*Helicasa*)

También participan otras enzimas, como son las llamadas *helicasa*, 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 5 fases: iniciación, elongación y terminación, la iniciación, se da a partir del origen del replicón donde se forma la o las horquillas de replicación, por la acción de *helicasa*s 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, *helicasa* y las proteínas de unión a ADN de cadena sencilla (Proteínas SSB). Las *ADN helicasa* usan la energía liberada de la hidrólisis del ATP a ADP para promover la separación de las dos cadenas de ADN, las Proteínas SSB se unen a las cadenas de ADN ya separadas por la *helicasa*, evitando que se vuelvan a unir antes de que se adicionen los nucleótidos correspondientes, *helicasa* y ATPasa, y separa la cadena de ADN conjugante durante la Translocación utilizando ATP, aunque se conoce el sentido en el que es transferido el ADN durante la conjugación, todavía es incierto el rol de ciertas

proteínas en el anclaje y protección del ADN, y en la formación de poros en las membranas, se ha propuesto que el ADN de cadena sencilla.

Helicasa y las proteínas de unión a ADN de cadena sencilla (Proteínas SSB), las ADN *helicasa* usan la energía liberada de la hidrólisis del ATP a ADP para promover la separación de las dos cadenas de ADN, las Proteínas SSB se unen a las cadenas de ADN ya separadas por la *helicasa*, evitando que se vuelvan a unir antes de que se adicionen los nucleótidos correspondientes.

ADN *Topoisomerasas* son enzimas que cambian la extensión y forma de la superhélice del ADN, y proporcionan el giro que permite la propagación continua de la horquilla de replicación. (Fig. 8)

(<http://www.microbiología.com.ar/bacteriología/genética.php>)

2.3.1.3. Proteína ADN G (*Girasa*)

Las *Topoisomerasas* promueven la separación o la concatenación de los ADN circulares, deshacen los nudos o enredos en el ADN y también participan de una manera esencial en ciertos tipos de recombinación, han sido identificadas dos clases generales de *Topoisomerasas* en una amplia variedad de organismos, las *Topoisomerasas* de tipo I (enzimas de corte-cierre) que remueven por cada ciclo de reacción un giro del ADN, esta enzima corta una de las dos cadenas de ADN facilitando su rotación hasta que se emparejan ambas cadenas, luego se unen los extremos cortados y con esto queda eliminando un giro de la doble cadena de ADN, en los Procariotes solo deshacen giros negativos mientras que en los Eucariotes la ADN *Topoisomerasas* de tipo I elimina tanto giros negativos como positivos, las ADN *Topoisomerasas* de tipo II remueven giros positivos y negativos en el ADN, pero a diferencia de las de tipo I, catalizan la ruptura transitoria de las dos cadenas de ADN, uniando posteriormente los segmentos de ADN

que han sido cortados, con la ADN *Topoisomerasa* de tipo II en cada ciclo se remueven dos giros negativos o positivos, un tipo especial de ADN *Topoisomerasas* de tipo II que se encuentra en bacterias es la *Girasa*, esta enzima remueve un giro positivo de la superhélice de ADN e introduce un giro negativo el ADN de cadena sencilla captado es protegido de la acción de Endonucleasas por su asociación a Proteínas SSB específicas de la competencia, y forma un complejo de eclipse. (Fig. 8)

(<http://www.microbiologia.com.ar/bacteriologia/genetica.php>)

2.3.1.4. Primosoma

Es un complejo proteico que incluye a la enzima primasa y está encargado de la síntesis del "primer".

En la síntesis de la cadena de reemplazo del donador, opera de modo continuo, que sería equivalente a la síntesis de la cadena adelantada de la replicación normal, esta síntesis se inicia a partir de un ARN cebador ("primer" en inglés) sintetizado por un primosoma que reconoce una secuencia (n') situada cerca de *oriT*.

Síntesis de la cadena complementaria en el receptor, a diferencia de la anterior, es discontinua, a base de fragmentos de Okazaki (por lo tanto, sería la equivalente de la síntesis de la cadena retrasada).

En ambos casos parece ser que el primosoma responsable de los ARN cebadores no es exactamente idéntico al que se emplea en la replicación "normal", sino que está modificado por alguna función específica codificada por el plásmido F (una primasa específica del factor F; (http://www.biologia.edu.ar/microgeneral/microianez/27_micro))

2.3.1.5. ADN Polimerasas (III ,II ,I)

La ADN *polimerasa I* pesa 109 kDa, se encuentra involucrada en la reparación del ADN dañado y en un papel secundario en la replicación semiconservativa; la ADN *polimerasa II* pesa 120 kDa que también esta

involucrada en la reparación, y la ADN *polimerasa III* que es un multímero de más de 250 kDa que es la responsable de la síntesis del ADN (Fig. 8;).

Las tres tienen actividades enzimáticas de elongación y de Exonucleasa, las ADN *polimerasas* sintetizan una cadena nueva de ADN adicionando nucleótidos al extremo 3'-OH complementando las bases del ADN de la cadena templado, y cuando la base que se agregó es una base errónea la *polimerasa* tiene la capacidad de removerla (<http://www.microbiología.com.ar/bacteriología/genética.php>)

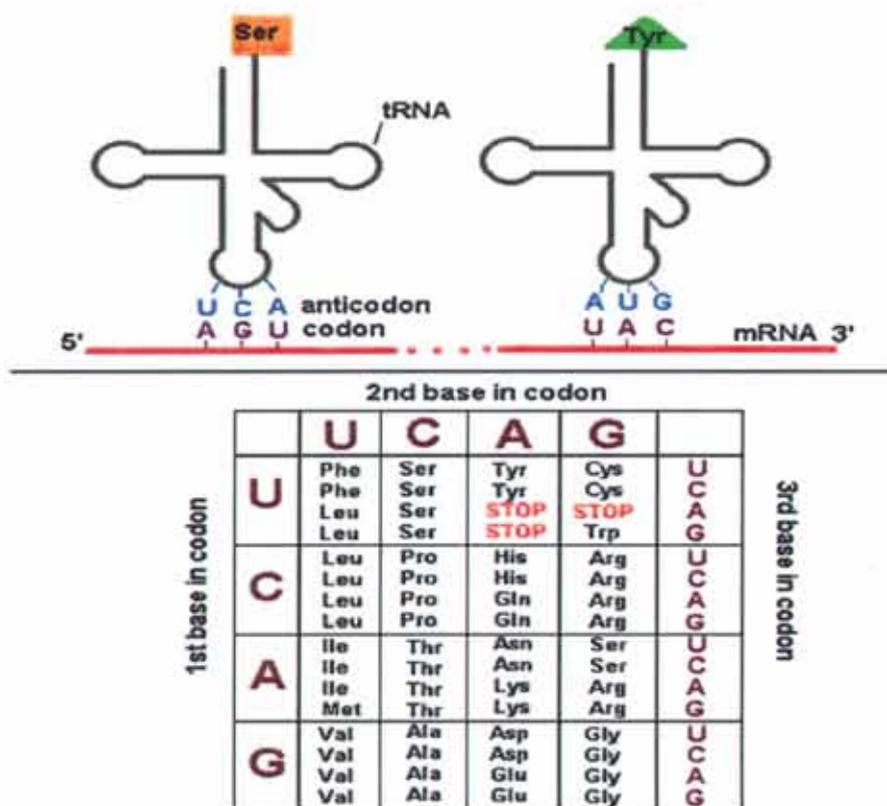
La replicación semiconservativa del ADN genera dos moléculas idénticas. para la replicación del ADN hacen falta varias enzimas, la ADN *polimerasa III* necesita para iniciar la síntesis un cebador o primer que es sintetizado por una ARN *polimerasa* especial, algunas proteínas desenrollan la hélice de 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 de cada 10⁷ a 10¹¹ 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. 8)

(<http://www.microbiología.com.ar/bacteriología/genética.php>)

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 con roles en la reparación de rupturas o de errores en las moléculas de ADN.

También participan otras enzimas, como son las llamadas *helicasa*, 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 del replicón donde se forma la o las horquillas de replicación, por la acción de *helicasas* 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 (<http://www.microbiología.com.ar/bacteriología/genética.php>)



Código Genético

Fig. 7. Esquema del ARN de transferencia y tabla de aminoácidos que constituyen los codones del ARNt (tomada de: <http://www.garlandscience.com/ecb/about.html>)

2.4. Elongación del cromosoma

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 el molde de una cadena de ADN, un cebador y por supuesto los nucleótidos, 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 (;Fig. 8;).

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 ADN, comparación entre la expresión de los genes eucariotas y Procariotas, los ARNm de las Procariotas son a menudo poligénicos, es decir que contienen información para más de una proteína, el extremo 5' se traduce cuando todavía se está transcribiendo el extremo 3', los ARNm eucariotas son monogénicos y requieren de modificaciones postranscripcionales antes de atravesar la membrana nuclear y llegar al citoplasma donde es traducido, código genético se producen 64 combinaciones diferentes (compuestas de 3 nucleótidos) basados en los 4 nucleótidos conocidos, cada combinación codifica para uno de los 20 amino ácidos conocidos, además de la señal de parar y señal de inicio, el código es universal, todos los organismos utilizan el mismo código para hacer sus proteínas, sin embargo, se observan algunas excepciones en los hongos, protozoarios y el ADN mitocondrial, ya que varios codones codifican para más de un amino ácido, se dice que el código es degenerado (Fig. 8;).

2.4.1. Fragmentos de Okasaki.

Cuando una hélice tiene libre este terminal disponible y su formación es continua, la otra hélice se construye en pedazos y luego se une por medio de la enzima *Ligasa*, estas unen las cadenas de ADN durante la replicación, reparación, y recombinación en general. Las *ligasas* pueden formar enlaces fosfodiéster entre los grupos fosfato e hidroxilo de desoxinucleótidos adyacentes en un ADN con un corte. Estas enzimas son las responsables de unir en una sola hebra los fragmentos de Okazaki formados como consecuencia de la síntesis discontinua de ADN

Proteínas desestabilizadoras de la hélice, el ADN de doble cadena requiere desenrollarse para que se pueda llevar a cabo la copia de cada una de sus cadenas, la separación de la doble hélice no ocurre de una manera espontánea, ésta es llevada a cabo por dos familias de proteínas: las ADN *helicasa* y las proteínas de unión a ADN de cadena sencilla (Proteínas SSB). Las ADN *helicasa* usan la energía liberada de la hidrólisis del ATP a ADP para promover la separación de las dos cadenas de ADN, las Proteínas SSB se unen a las cadenas de ADN ya separadas por la *helicasa*, evitando que se vuelvan a unir antes de que se adicionen los nucleótidos correspondientes (<http://www.microbiología.com.ar/bacteriología/genética.php>)

En las horquillas de replicación siempre hay una hebra que se sintetiza de forma continua en el mismo sentido en que se abre la horquilla de replicación, la llamada hebra conductora, y la otra que se sintetiza en varios fragmentos, los denominados Fragmentos de Okazaki y que se conoce como hebra seguidora o retardada, ya que se sintetiza en sentido contrario al de apertura de la horquilla.

2.5. Corrección de la duplicación

Si bien la sobrevivencia a largo plazo de una especie puede verse favorecida por cambios en su información genética, a corto plazo se requiere que esta información se conserve, para esto es necesario un mecanismo preciso de copiado previo a la división celular y también un mecanismo de reparación de los daños accidentales que pueden ocurrir en el ADN, muchos de estos cambios espontáneos son transitorios ya que inmediatamente son reparados, por la ADN *polimerasa* solo puede añadir nucleótidos al extremo 5' de una cadena si los nucleótidos previamente añadidos están correctamente apareados con sus nucleótidos complementarios en la cadena molde, se

reporta que la función del cebador de ARN es suministrar una secuencia de nucleótidos correctamente apareada en la que pueda comenzar la síntesis de ADN, durante la síntesis, se puede cometer errores al añadirse un nucleótido incorrecto a la nueva cadena en formación, es decir la ADN *polimerasa* retrocede y elimina nucleótidos hasta que encuentra un nucleótido correctamente apareado, esta enzima tiene actividad de exonucleasa 3 a 5, entonces cuando alcanza el ultimo nucleótidos apareado correctamente, la enzima detiene su movimiento de retroceso y reinicia el movimiento en la dirección 5 a 3, añadiendo nucleótidos a la cadena en crecimiento mientras avanza , esta capacidad de corrección de errores asegura la precisión de la replicación del ADN, las polimerasas que no poseen la actividad exonucleasa 3 a 5 como es el caso de las ARN polimerasas y de la transcriptasa inversa no son capaces de reparar la cadena en crecimiento y por lo tanto la frecuencia de errores durante la síntesis es mucho mayor.

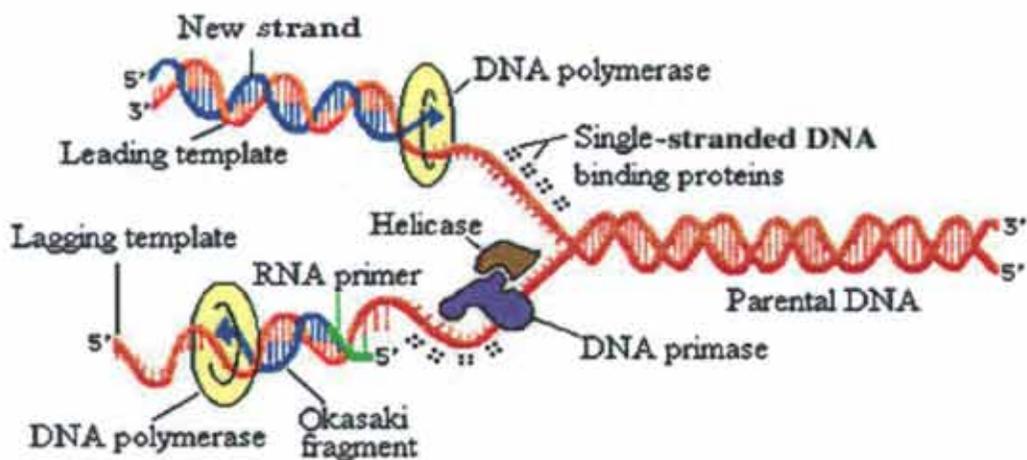


Fig. 8. Replicación en forma de tenedor con la participación de proteínas

(tomada de: <http://www.garlandscience.com/ecb/about.html>)

3. ARN (ÁCIDO RIBONUCLEICO).

3.1. Composición química.

Esta compuesta por distintas bases nitrogenadas (átomos de carbono y nitrógeno), adenina, guanina, citosina y uracilo, un azúcar (ribosa) y un grupo fosfato¹

3.2. Conformación

Los ácidos nucleicos son macromoléculas compuestas de nucleótidos unidos en forma covalente por medio de enlaces fosfodiéster entre los carbonos de las posiciones 3' y 5' de dos residuos de azúcares adyacentes, que conforman un esqueleto de azúcares y fosfatos¹.

3.3. Tipos.

Los ribosomas están formados por una proteína y ARN, el grupo de ribosomas unidos a un ARNm recibe el nombre de polirribosoma o polisoma, como cada ribosoma pasa a lo largo de toda la molécula de ARNm, lee el código, es decir, la secuencia de bases de nucleótidos del ARNm, la lectura que se denomina traducción, tiene lugar gracias a un tercer tipo de molécula de ARN de transferencia (ARNt), que se origina sobre otro segmento del ADN, sobre un lado de la molécula de ARNt hay un triplete de nucleótidos y al otro lado una región a la que puede unirse un aminoácido específico (con la ayuda de una enzima específica), el triplete de cada ARNt es complementario de una secuencia determinada de tres nucleótidos el codón en la cadena de ARNm, debido a esta complementariedad, el triplete es capaz de reconocer y adherirse al codón. Por ejemplo, la secuencia uracilo-citosina-uracilo (UCU) sobre la cadena de ARNm atrae al triplete adenina-guanina-adenina (AGA) del ARNt, el triplete del ARNt recibe el nombre de anticodón (Fig. 6, 7 y 9) ¹.

Como las moléculas de ARNt se desplazan a lo largo de la cadena de ARNm en los ribosomas, cada uno soporta un aminoácido, la secuencia de codones en el ARNm determina, por lo tanto, el orden en que los aminoácidos son transportados por el ARNt al ribosoma, en asociación con el ribosoma, se establecen enlaces químicos entre los aminoácidos en una cadena formando un polipéptido, la nueva cadena de polipéptidos se desprende del ribosoma y se repliega con una forma característica determinada por la secuencia de aminoácidos, la forma de un polipéptido y sus propiedades eléctricas, que están también determinadas por la secuencia de aminoácidos, dictarán si el polipéptido permanece aislado o se une a otros polipéptidos, así como qué tipo de función química desempeñará después en el organismo¹

El ácido ribonucleico (ARN) es importante en la expresión celular de la información genética, se conocen tres tipos fundamentales de ARN: ARN mensajero (ARNm), ARN de transferencia (ARNt) y ARN ribosómico (ARNr), todos ellos son productos de la Transcripción del ADN, hay tres diferentes claves en la química del ARN y del ADN (Fig. 9).

- 1.- El ARN posee el azúcar ribosa en lugar de la desoxirribosa
- 2.- El ARN posee uracilo en lugar de timina
- 3.- Excepto en ciertos virus, el ARN no es bicatenario sino monocatenario.

El cambio a ribosa afecta a algunas propiedades químicas de un ácido nucleico, de modo que enzimas que afectan al ADN no tiene efecto sobre el ARN y viceversa, el cambio de timina por uracilo no afecta al emparejamiento de bases ya que las dos emparejan exactamente igual con la adenina¹.

Es necesario señalar que el ARN actúa en dos niveles, el genético y el funcional; a **nivel genético** el ARN lleva la información genética contenida en

el ADN (ARNm; en el caso del virus ARN, tiene una función genética directa), a **nivel funcional** el ARN actúa como una macromolécula propiamente dicha, sirviendo en la síntesis de proteínas (ARNt). Algún ARN incluso tiene actividad catalítica, en esta sección nos centraremos en cómo se sintetiza el ARN (Fig. 6;).

La Transcripción de la información genética desde el ADN hasta ARN es llevada a cabo por acción de la enzima ARN *polimerasa*, que cataliza la formación de enlaces fosfodiéster entre ribonucleótidos, la ARN *polimerasa* requiere la presencia de ADN que actúa como molde, los precursores del ARN son los ribonucleótido trifosfato ATP, GTP, UTP y CTP, la química de la síntesis de ARN es muy parecida a la del ADN, durante la elongación de la cadena de ARN, se añaden nucleótidos al extremo oxidrilo 3' de la ribosa precedente que se polimerizan con la liberación de dos enlaces fosfato de alta energía; así, en la síntesis de ARN (como en la de ADN) la dirección de crecimiento es desde el extremo 5' hacia el 3' y la banda molde es antiparalela, al contrario que la ADN *polimerasa*, la ARN *polimerasa* puede iniciar cadenas (el nucleótido inicial en una cadena de ARN retiene los tres fosfatos), la primera base del ARN es casi siempre una purina, bien adenina o guanina, en la mayoría de las ocasiones el molde de ADN, para la ARN *polimerasa* es una molécula bicatenaria, pero para un gen dado solo una de ellas será transcrita (solo una codifica), la ARN *polimerasa* es diferente entre los distintos grupos microbianos; bacteria, Archaea y Eukarya, lo que se indica a continuación concierne sobre todo a la ARN *polimerasa* del grupo bacteria que posee la estructura más sencilla y sobre la que más se conoce, la *polimerasa* es una enzima grande que contacta con muchas bases simultáneamente, las proteínas pueden interactuar con el ADN por que parte de las moléculas de las bases están expuestas en el surco mayor del ADN, para iniciar apropiadamente la cadena de ARN, la *polimerasa* debe escoger la región apropiada del ADN, estas regiones se denominan promotores, solo

una cadena de ADN se transcribe cada vez, la elección de la banda que se transcribe viene a su vez determinada por la orientación de la secuencia promotora, la ARN *polimerasa* se aleja del promotor y se sintetiza una cadena antiparalela de ARN con el extremo 5' libre¹

Una vez que se une la ARN *polimerasa* puede continuar todo el proceso de Transcripción, en este proceso la doble hélice en la secuencia promotora se abre por la ARN *polimerasa*, a medida que se aleja, la *polimerasa* induce pequeños desenrollamientos que se cierran tan pronto pasa la enzima, como resultado de esto las bases del molde quedan expuestas y pueden ser copiadas a ARN complementario, por lo tanto el promotor orienta a la ARN *polimerasa* en un sentido o en el otro, cuando una región del ADN tiene dos promotores cerca apuntando en direcciones opuestas, entonces ocurre la Transcripción simultánea en ambas direcciones, una vez formada una pequeña porción de ARN, el factor sigma se disocia, la mayoría de la elongación es realizada por el núcleo enzimático por si mismo, por lo tanto el factor sigma esta implicado solamente en la formación del complejo inicial ARN *polimerasa* ADN, la Transcripción termina en puntos específicos llamados finalizadores de Transcripción, al contrario que la replicación que implica la copia de todo un genoma, la Transcripción implica normalmente unidades mucho más pequeñas de ADN, a menudo genes únicos, esto permite a la célula transcribir genes específicos con frecuencias diferentes y es un mecanismo muy eficiente de controlar la expresión génica¹

3.3.1. ARN pequeño heterogéneo.

El ARN recién sintetizado por el ARN *Polimerasa* II se llama transcrito primario y a todos estos transcritos se les dio el nombre de ARN heterogéneo nuclear (hnARN) por la gran variedad en el tamaño del ARN en contraste con

el menor tamaño y más uniforme de las secuencias del ARN que codifican proteínas y consiste en largas secuencias intrónicas en los transcritos primarios, estos son modificados en sus extremos 5' y 3' a medida que se sintetizan de una forma característica que los diferencia claramente de los producidos por las otras ARN *Polimerasas*, que posteriormente se utilizan en el citoplasma como señales de dichos transcritos se traducen en proteínas².

3.3.2. ARN mensajero.

El ARN mensajero (ARNm) lleva una copia del código genético obtenida a partir de la secuencia de bases del ADN celular, esta copia especifica la secuencia de aminoácidos de las proteínas (Fig. 9)¹

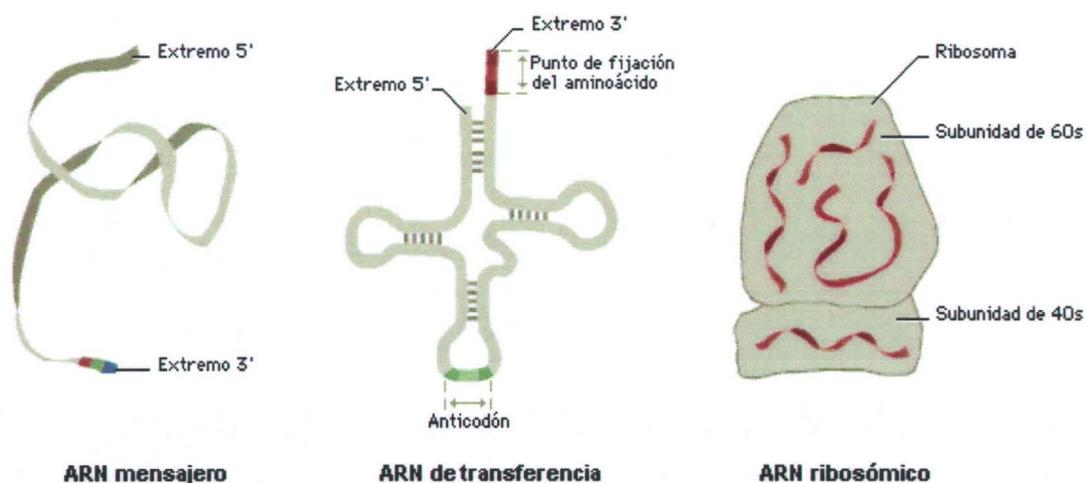


Fig. 9. Tipos de ARN (Tomado de Enciclopedia Encarta 2005)

3.3.3. ARN de transferencia.

La traducción del mensaje del ARN en una secuencia específica de aminoácidos se lleva a cabo con la intervención de un elevado número de

ARNs de transferencia (ARNt), este ARN de transferencia es una molécula adaptadora que tiene dos especialidades, una para un codón en el ARNm y la otra para un aminoácido determinado, cada aminoácido se une a su ARNt. Actualmente se conoce bien la estructura detallada del ARNt, existen al menos 60 ARNt, específicos en bacterias y son moléculas cortas monocatenarias de 73 a 93 kpb, cuando se comparan unos con otros se observa que hay regiones constantes y regiones variables, los ARN contienen bases Púricas y Pimídicas ligeramente diferentes de las bases normales que se encuentran en otros ARNs ya que se encuentran frecuentes metiladas, algunas de estas bases poco usuales son la *seudouridina*, *inosina*, *dihidrouridina*, *ribotimidina*, *metilguanosina*, *dimetil guanosina* y *metil inosina*, (bases metiladas) estas modificaciones se hacen después de la transcripción y son necesarias, junto con otras modificaciones, para conseguir un ARN totalmente funcional, aunque la molécula del ARN es monocatenaria, existen extensas regiones bicatenarias (Fig. 9).

3.3.4. ARN ribosomal

El ARN ribosómico (ARNr) se encuentra en los *ribosomas* Celulares estructuras especializadas situadas en los puntos de síntesis de proteínas; (Fig. 9)¹

4. 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 Procariotas comprende una serie de mecanismos independientes del evento de reproducción celular, estos mecanismos son llamados transformación, transducción y conjugación³

4.1. Transformación.

La transformación es un proceso de transferencia de genes en donde la célula bacteriana capta ADN desnudo a partir del medio, lo incorpora y expresa, para que la célula pueda captar el ADN desnudo debe encontrarse en estado de "competencia", el estado de competencia ocurre naturalmente en algunos microorganismos, competencia fisiológica y puede ser inducido artificialmente en otros, competencia artificial, el ADN exógeno internalizado puede integrarse mediante recombinación al cromosoma o a un Plásmido o puede establecerse como un replicón autónomo si contiene un origen de replicación y puede enrollarse³

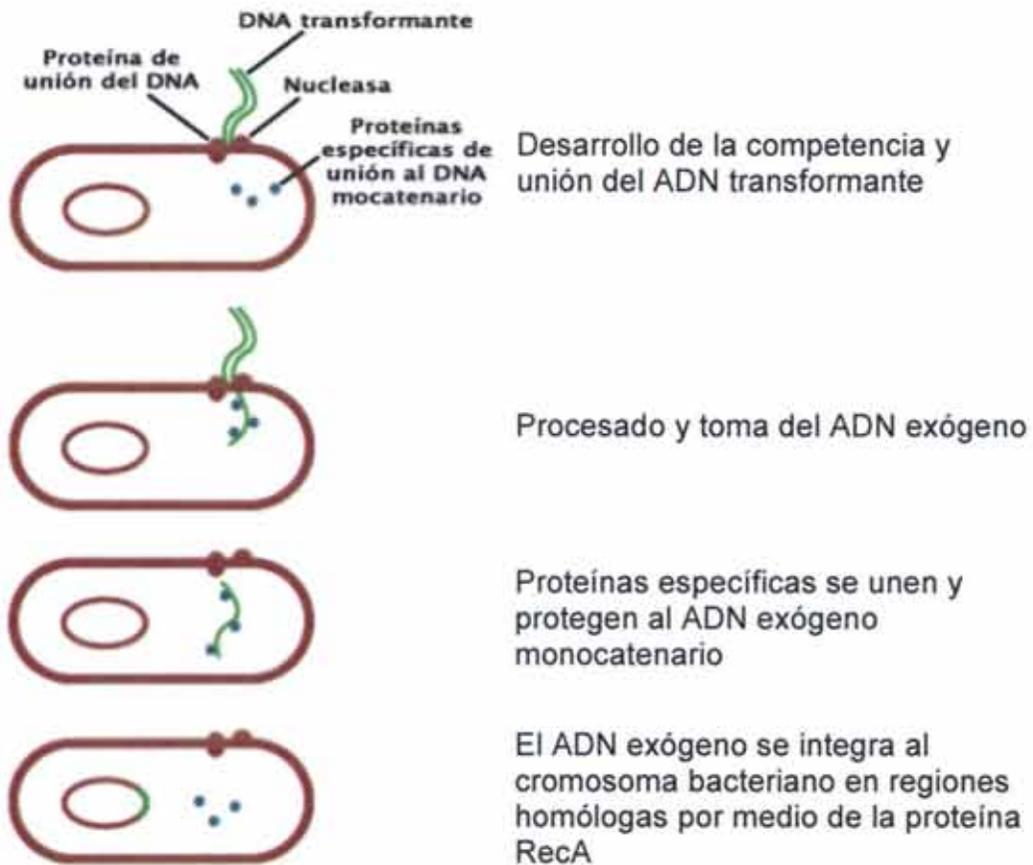


Fig. 10. Esquema de los procesos de transformación del ADN bacteriano (tomada de: <http://www.microbiología.com.ar/bacteriología/genética.php>)

La transformación puede dividirse en diferentes etapas que son comunes a todas las bacterias (Fig. .10, 11 y 12):

1. Desarrollo de la competencia
2. Unión del ADN
3. Procesado y captación del ADN
4. Integración del ADN por recombinación y expresión

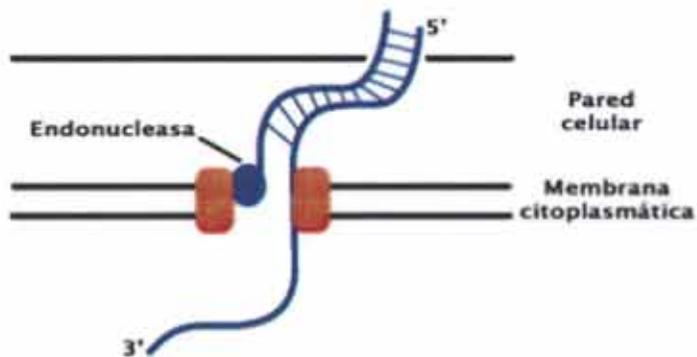


Fig. 11. Captación del ADN durante la transformación en una bacteria Gram positiva

(tomada de: http://www.biologia.edu.ar/microgeneral/microianez/27_micro)



Fig. 12 Captación del ADN durante la transformación en una bacteria gramnegativa mediada por los transformasomas. (tomada de: http://www.biologia.edu.ar/microgeneral/microianez/27_micro)

Desarrollo de la competencia: La "competencia" requiere complejos cambios fisiológicos que ocurren en determinadas etapas de crecimiento y está asociada a diversos fenómenos en distintas especies de bacterias, en *Streptococcus pneumoniae* se ha descrito que el estado de "competencia" se logra cuando se alcanza cierta densidad celular crítica durante la fase de crecimiento exponencial y una concentración efectiva de una proteína extracelular, a menudo denominada factor de competencia (FC), que induce la síntesis de ciertas proteínas involucradas en el proceso de transformación.

Este factor de competencia liberado por algunas células inducen la competencia de las restantes células presentes en el cultivo, durante este estado las células además liberan al medio autolisinas que desenmascaran el sitio de unión y captación del ADN, en *Bacillus subtilis* la competencia se produce durante la fase estacionaria cuando la síntesis de ácidos nucleicos está disminuida, en *Haemophilus spp*, la competencia está asociada a células que no se dividen y en *Neisseria gonorrhoeae*, la competencia está relacionada con la presencia de pilis, ya que las células con pilis son naturalmente competentes mientras que las células sin pilis son incapaces de alcanzar la competencia

En ciertas especies de bacterias se puede inducir la "competencia" por mecanismos artificiales debido a que son incapaces de alcanzar este estado naturalmente, en uno de ellos las bacterias son colocadas en soluciones de CaCl_2 (cloruro de calcio) que por mecanismos desconocidos permiten la absorción y captación de ADN exógeno, otro mecanismo es la electroporación, en la que por medio de pulsos eléctricos se abren pequeños poros en las bacterias por los cuales ingresa el ADN exógeno

Unión del ADN: La célula une mediante un receptor que se encuentra en su superficie principalmente ADN de doble cadena aunque pueden unir limitadas cantidades de ADN de cadena sencilla, la especificidad del ADN que la célula puede variar con la especie bacteriana, las bacterias grampositivas como el *Streptococcus pneumoniae* y el *Bacillus subtilis* pueden unir cualquier tipo de ADN doble cadena que este presente en el medio, esto significa que pueden unir tanto ADN homólogo como heterólogo, en cambio las bacterias gramnegativas como el *Haemophilus sp* y *Neisseria spp*, sólo pueden unir ADN homólogo o de especies muy semejantes, por ejemplo, en *Haemophilus* el internamiento del ADN requiere una secuencia

específica de 11 pares de bases (5'-AAGTGCGGTCA-3'), la que se encuentra repetida 600 veces en su genoma.

La unión del ADN transformante involucra una primera fijación reversible que luego se transforma en irreversible, durante la fijación de tipo irreversible el ADN no puede soltarse ni reemplazarse

Procesado y captación del ADN: Una vez que el ADN de doble cadena se ha fijado irreversiblemente a la célula sufre diversos procesos que llevan a la captación de una de las cadenas del ADN, en las bacterias Grampositivas el ADN de doble cadena unido es roto (ruptura del enlace fosfodiéster entre dos nucleósidos de una misma cadena) por una proteína que se cree forma parte del receptor del ADN, este receptor empuja la cadena complementaria hacia el interior de la célula y la cadena rota es degradada a oligonucleótidos por una endonucleasa asociada, de esta manera sólo ingresa a la célula una de las cadenas del ADN originalmente unido, en esta etapa, el ADN de cadena sencilla introducido, se encuentra en una etapa de eclipse, ya que ha perdido la capacidad de servir como ADN "donante" para una nueva transformación, esto es debido porque el ADN de cadena sencilla es unido y captado en forma muy pobre por células competentes, el ADN de cadena sencilla captado, es protegido de la acción de endonucleasa por su asociación a Proteínas SSB específicas de la competencia, y forma un complejo de eclipse, en las bacterias gramnegativas, el ADN de cadena doble específico que se ha unido a la célula receptora es tomado por unas vesículas denominadas *Transformasomas*, dentro de estas vesículas una de las cadenas es degradada y la otra es internalizada por un proceso similar al del neumococo, sin embargo en bacterias como *Haemophilus sp* no se han observado intermediarios de ADN de cadena sencilla en el citoplasma y por lo tanto hay ausencia de ADN en eclipse, los *transformasomas* protegen al ADN de las ADNasas externas y de las enzimas de restricción Celulares (<http://www.microbiología.com.ar/bacteriología/genética.php>)

Integración del ADN por recombinación y expresión: En *Streptococcus pneumoniae*, *Bacillus subtilis* y *Haemophilus influenzae* los ADNs donantes y receptores forman un producto que es ADN heterodúplex, la integración del complejo ADN de cadena sencilla-Proteínas SSB a regiones homólogas del cromosoma es muy rápida en *Streptococcus pneumoniae* y está mediada por enzimas de recombinación como la *RecA.*, sin embargo el ADN que no contiene homología es degradado por Nucleasas Celulares, en las bacterias como el *Haemophilus sp* el ADN de cadena sencilla se integra al cromosoma en regiones homólogas por recombinación a medida que ingresa a la célula desde los transformasomas. Durante este proceso ciertas bacterias son llamadas competentes y 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 polisacárida a su alrededor, las bacterias con cápsula tienen un aspecto liso (*s*) cuando se cultivan en placas de agar y son capaces de matar a los ratones que son inyectados experimentalmente con una suspensión bacteriana, las colonias con bordes rugosos (*r*) de *S. pneumoniae*, carecen de cápsula y no son letales al infectar ratones, Frederick Griffith en 1928 observó por primera vez la transformación cuando mezcló bacterias *s* muertas con bacterias *r* vivas y encontró que al inyectar la mezcla en ratones resultaba letal, de esto concluyó que las *r* habían sido sustituidas o "transformadas" en bacterias *s*, ahora capaces de fabricar el polisacárido capsular virulento (<http://www.microbiología.com.ar/bacteriología/genética.php>)

La capacidad de captar el ADN exógeno y conservarlo en forma estable e interaccionar con él se denomina competencia, la competencia depende de la presencia de un sistema de captación de ADN específico asociado a membrana, ejemplos de bacterias con competencia natural son *Haemóphilus 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 (<http://www.microbiología.com.ar/bacteriología/genética.php>)

4.2. Transducción.

Es un mecanismo de transferencia de genes bacterianos en donde participan virus bacterianos o fagos, existen dos tipos de 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 (; Fig. 13) www.microbiología.com.ar/bacteriología/genética.php.

4.2.1. Generalizada.

Se produce cuando un segmento de ADN bacteriano es encapsulado por error y ésta infecta una nueva célula, estos fagos de transducción

generalizada pueden contener cualquier porción del ADN bacteriano. La transducción generalizada comienza con el empaquetamiento accidental de una porción del ADN bacteriano en una partícula viral normal, esta partícula transductora es liberada por la lisis celular, y es capaz de adherirse a una nueva célula e inyectar el ADN, después de la inyección en la célula receptora, el ADN transductor puede recombinarse con ADN homólogo de la célula, los fagos de transducción generalizada más estudiados son el p22 de *Salmonella typhimurium* y el p1 de *Escherichia coli* (Fig. 13).

El empaquetamiento del ADN viral comienza por sitios específicos del concatámero viral (sitios *Pac*), estos sitios *Pac* no se encuentran en el genoma bacteriano, pero aparentemente secuencias similares pueden ser reconocidas por el fago y producirían la encapsidación errónea del ADN bacteriano, sitios similares a los sitios *Pac* han sido encontrados tanto en *E. coli* como en *S. typhimurium*.

La cantidad de partículas de transducción generalizada que pueden producir las células infectadas es muy variable, mientras algunas células no producen ninguna, otras pueden llegar a encapsidar el 20% del genoma bacteriano, si bien en este tipo de transducción todas las regiones del ADN bacteriano pueden ser encapsidadas, algunos *loci* (locus) son transducidos con mayor frecuencia (<http://www.microbiología.com.ar/bacteriología/genética.php>)

La transducción generalizada no es un proceso que logra células transductantes con alta eficiencia, se calcula que aproximadamente el 90% de los ADN bacterianos inyectados por partículas de transducción generalizada a células receptoras son abortivos, esto significa que la información genética introducida no se replica con el genoma de la célula hospedadora y es heredado por una de las células hijas, solamente un bajo porcentaje de ADN donante se asocia con el ADN

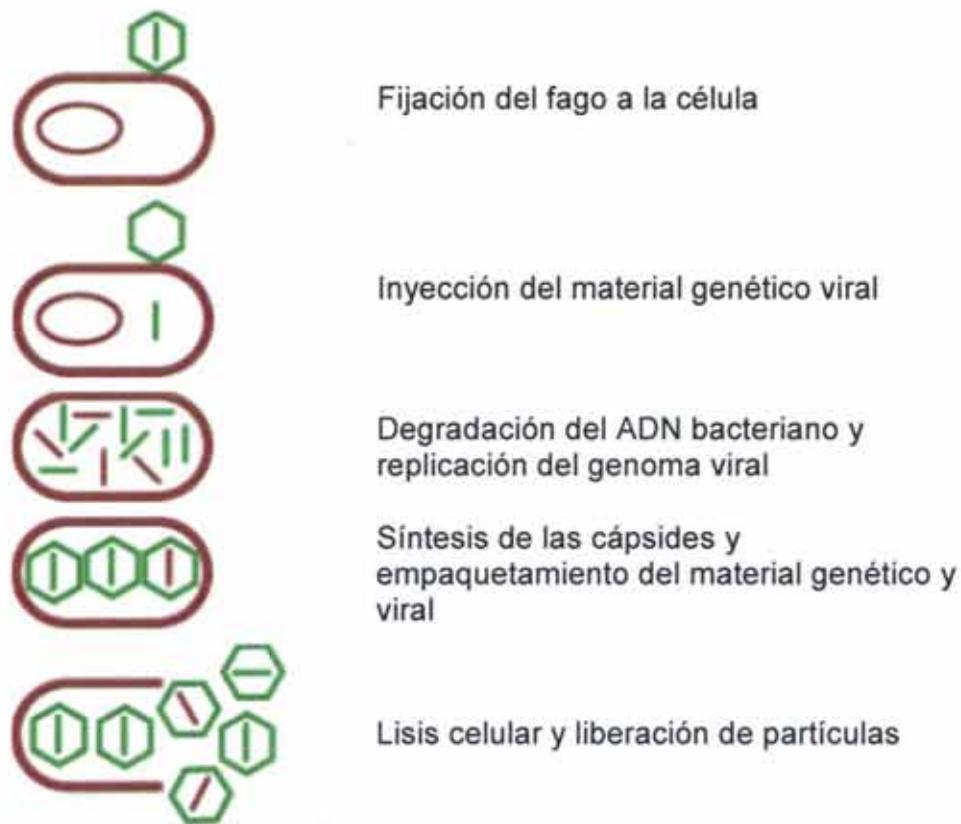


Fig. 13. Esquematación del paso del ADN de un fago a una bacteria receptora (tomada de: <http://www.microbiología.com.ar/bacteriología/genética.php>).

El ADN lineal donante inyectado por la partícula transductora puede incorporarse de diversas maneras con el ADN bacteriano: incorporación de pequeños fragmentos para producir transductantes por sustitución, incorporación de una de las cadenas para producir un heteroduplex, incorporación de grandes fragmentos.

La transducción generalizada puede obtenerse con fagos temperados o seudotemperados, y también con fagos virulentos, los fagos virulentos son los que mayor número de partículas transductoras producen, por lo tanto los transductantes potenciales deben ser protegidos de las partículas virulentas, esta protección se logra con una baja multiplicidad de infección y la adición

de un antisuero o agente quelante después de la infección inicial para inhibir un nuevo ciclo viral (www.microbiología.com.ar/bacteriología/genética.php)

4.2.2. Especializada.

Se produce cuando el ADN que ha sido encapsidado es un híbrido formado por ADN del fago y de la bacteria, y este virus, luego de la lisis celular, infecta una nueva célula. Los fagos de transducción especializada contienen un fragmento específico del ADN bacteriano (Fig. 14).

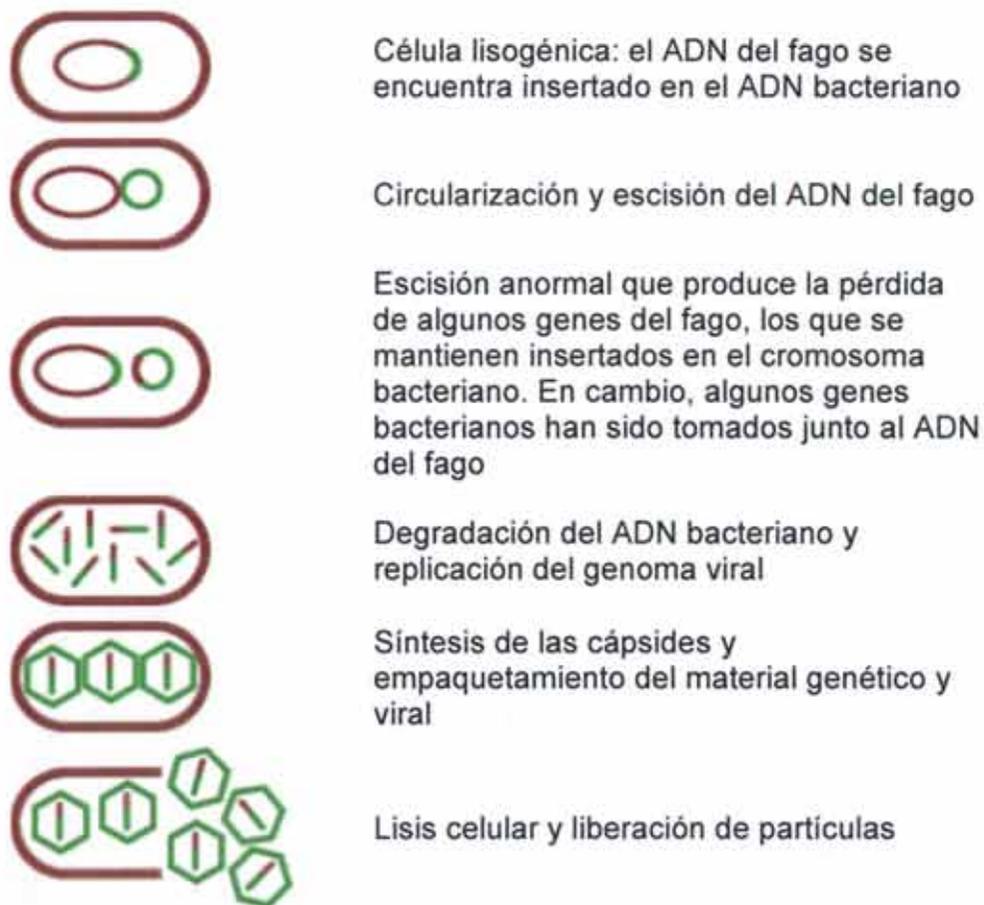


Fig. 14 Esquema de Transducción Especializada.
(tomada de: <http://www.microbiología.com.ar/bacteriología/genética.php>)

Difiere de la generalizada en que sólo un limitado grupo de genes pueden ser transferidos, estos genes se encuentran flanqueando la región en donde el fago temperado o lisogénico puede integrarse al cromosoma bacteriano, los fagos temperados como el *lambda* o *Phi 80* pueden integrar su material genético en sitios específicos del genoma bacteriano, por ejemplo el sitio de inserción del fago *lambda* se encuentra entre los genes GAL y BIO, sin embargo la integración de este fago en sitios de adsorción secundarios puede llevar a la transducción de otros marcadores bacterianos, estos tipos de fagos sintetizan enzimas de integración y escisión que catalizan la integración del fago en el sitio de adsorción y su correcta escisión, pero en algunos casos, pueden ocurrir escisiones anormales que llevan a que parte del genoma del fago *lambda* se separe junto a genes bacterianos cercanos. Estos eventos producen fagos que no contienen el genoma *lambda* completo, fagos defectivos, debido a que una región de los genes *lambda* quedan insertados en el cromosoma bacteriano, por otra parte el cromosoma bacteriano pierde algunos genes que son llevados por esta anormal escisión. Estos fagos que contienen genes bacterianos junto al material genético del fago se denominan fagos o partículas de transducción especializada. Los fagos de transducción especializada surgen con una frecuencia muy baja, los lisados Celulares que contienen a los fagos transductores pueden denominarse lisados LFT (Low Frequency Transduction - transducción de baja frecuencia) o lisados HFT (High Frequency Transduction - transducción de alta frecuencia), generalmente los lisados HFT son obtenidos a partir de una partícula transductora producida por un lisado LFT y de un fago "cooperador", este fago "cooperador" generalmente es necesario para la integración, escisión y/o replicación del fago transductor cuando este es defectivo, ya que aporta las enzimas necesarias que el fago transductor no codifica al haber perdido parte de su genoma. La inducción de estos dobles lisógenos produce lisados HFT que contienen al fago transductor y al fago "cooperador", y que pueden ser separados mediante gradientes de

concentración debido a diferencias en el tamaño de ambas partículas (; Fig. 15) (<http://www.microbiología.com.ar/bacteriología/genética.php>)

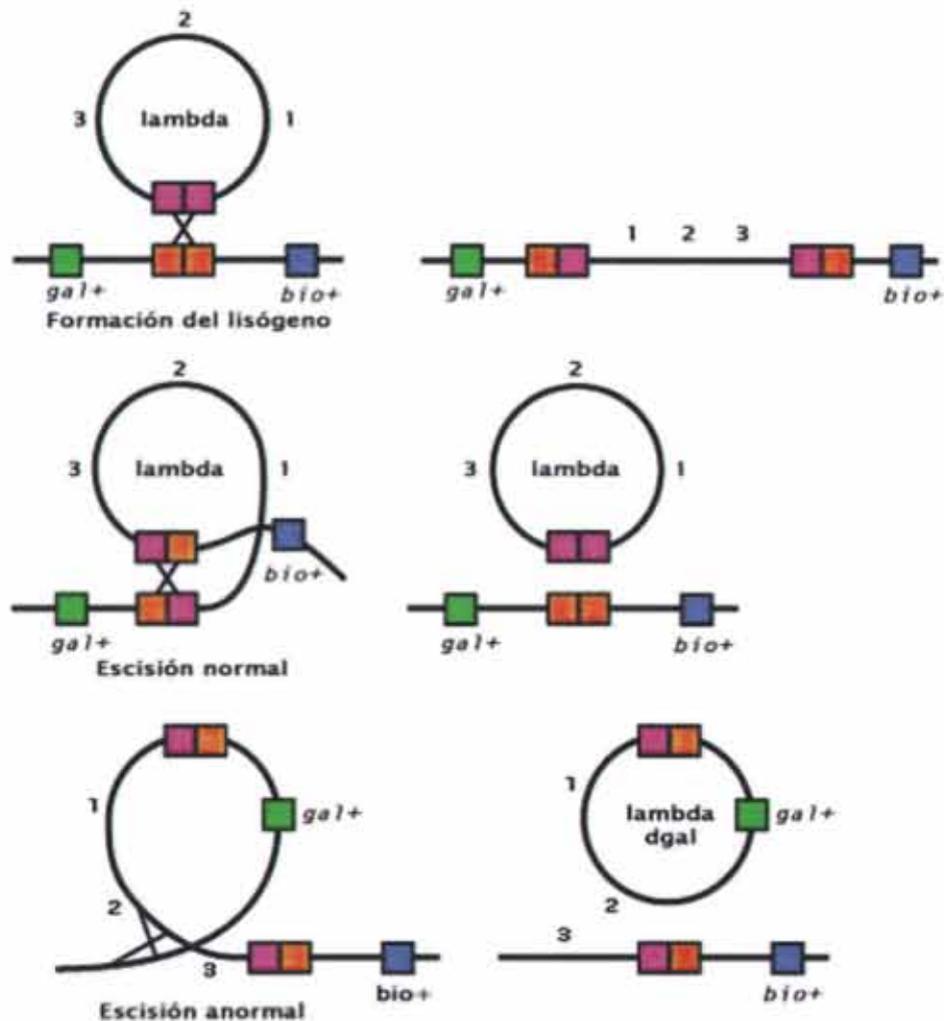


Fig. 15. Esquema que muestra la formación del lisógeno en forma normal y alterada durante la transducción especializada.

(tomada de: http://www.biología.edu.ar/microgeneral/microianez/27_micro)

Una vez que el fago inyecta el ADN transductante pueden ocurrir diferentes eventos, en todos los casos después de la inyección, se produce la

circularización y superenrollamiento del ADN transductor, luego el ADN viral puede producir la replicación de la progenie viral mediante un ciclo lítico, puede mantenerse inactivo y eliminarse por segregación, o puede recombinarse con el material genético bacteriano (Fig. 16;).

La transducción es un mecanismo de transferencia de genes bacterianos en donde participan virus bacterianos o fagos, existen dos tipos de transducción.

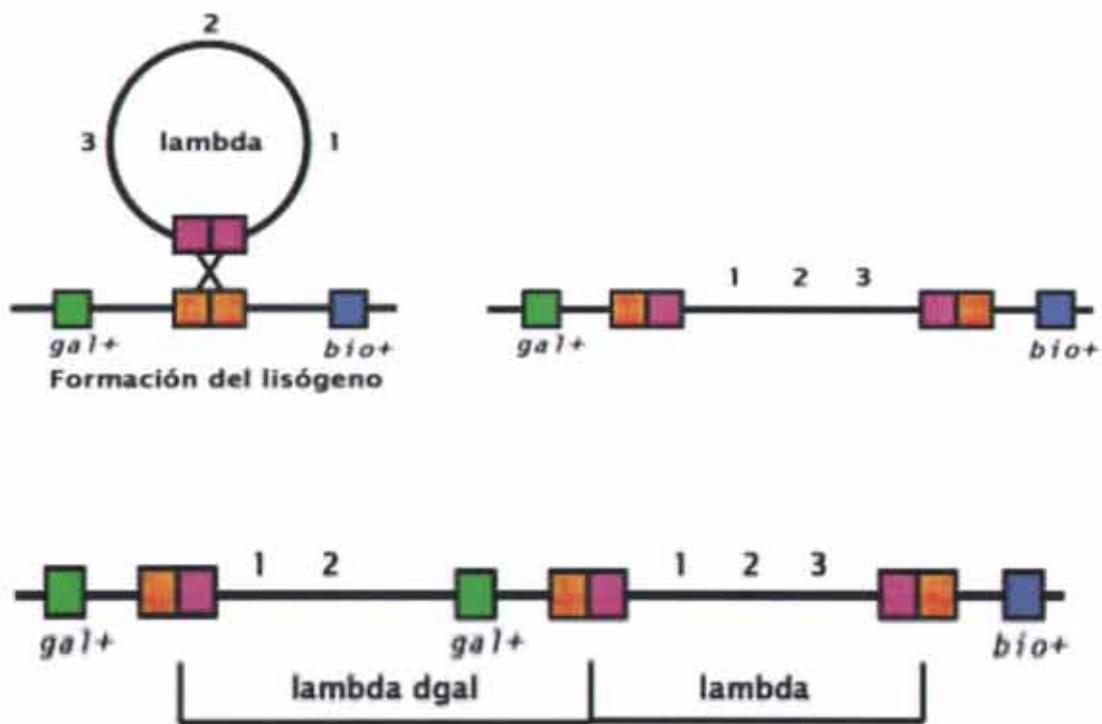


Fig. 16. Esquemas de la formación del lisógeno
(tomada de: http://www.biologia.edu.ar/microgeneral/microianez/27_micro)

Una vez que el fago inyecta el ADN transductante pueden ocurrir diferentes eventos en todos los casos, después de la inyección, se produce el enrollamiento y el superenrollamiento del ADN transductor, luego el ADN viral puede producir la replicación de la progenie viral mediante un ciclo lítico, puede mantenerse inactivo y eliminarse por segregación, o puede recombinarse con el material genético bacteriano, recombinación del ADN en la transducción especializada la recombinación del ADN transductor puede

ocurrir por tres vías diferentes: recombinación doble-sitio-específica: es un caso particular de la recombinación sitio específica, el ADN del fago transductor que contiene el sitio para la integración y en presencia de los adecuados productos genéticos, que generalmente son provistos por el fago "cooperador", puede sufrir una recombinación doble-sitio-específica con el sitio de fijación del fago en el cromosoma, generalmente, esto produce un merodiploide (parcialmente diploide) en el ADN bacteriano debido a que éste posee dos copias del mismo gen, una propia y otra insertada con el ADN del fago transductor.

Recombinación por adición: La recombinación entre las dos copias del ADN bacteriano lleva a la incorporación de toda la molécula de ADN del fago transductor y se forma un merodiploide, los transductantes de adición pueden ser generados sencillamente por la formación de ciertos empalmes entre una cadena del ADN transductante y bacteriano (holliday junction-uniones de carga) que llevan a la integración del ADN del fago transductor de manera análoga a la integración del transductor por recombinación sitio-específico (Fig. 17).

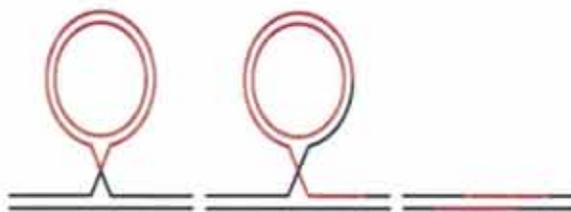


Fig. 17. Esquema de las uniones de carga en la recombinación por adición (tomada de: http://www.biologia.edu.ar/microgeneral/microianez/27_micro)

Recombinación por sustitución: La secuencia de información del ADN del fago transductor es transferida al ADN bacteriano sin la incorporación de todo el ADN transductor, este tipo de transductante es estable y se mantiene haploide (Fig. 18).

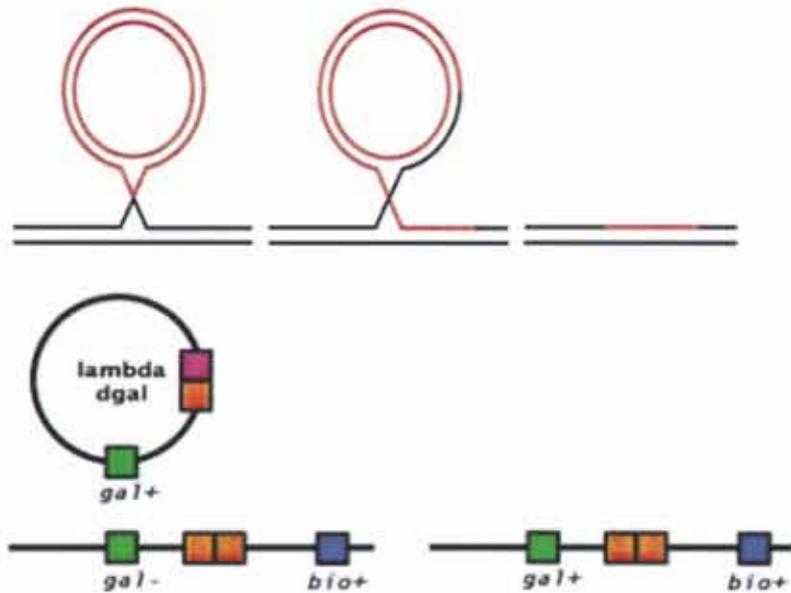


Fig. 18. Esquema de la recombinación por sustitución
(tomada de: http://www.biologia.edu.ar/microgeneral/microianez/27_micro)

4.3.- Transposicional.

El proceso por el que los genes se mueven de un lugar a otro en el genoma, ocurre en las frecuencias de 10^{-5} - 10^{-7} por generación, por lo tanto los genes en los organismos vivos son relativamente estables, no todos los genes son capaces de transposición, ya que esta ligada a la presencia de elementos genéticos especiales llamados elementos transponibles, a través de análisis genético se utiliza el método de hibridación del ADN y técnicas de secuencias se localizaron estos y son: los transposones y secuencia de inserción.

4.3.1. Transposones (Tn)

Los transposones son fragmentos de ADN incorporados en el ADN cromosómico, a diferencia de los Episomas y pro-fagos, los transposones

contienen un gen que produce una enzima que cataliza la inserción del Transposón a un nuevo sitio, también tienen secuencias repetidas de cerca de 20-40 nucleótidos de largo pegadas a cada extremo, las secuencias de inserción son cortas (60 a 1,500 pares de bases de longitud), los transposones sencillos no tienen más genes que los necesarios para la transposición, los transposones complejos son muchos más largos y pueden llevar genes adicionales, los genes incorporados en los transposones complejos se conocen como "genes saltarines" dado que pueden moverse a lo largo del cromosoma y también de cromosoma en cromosoma (;Fig. 19)

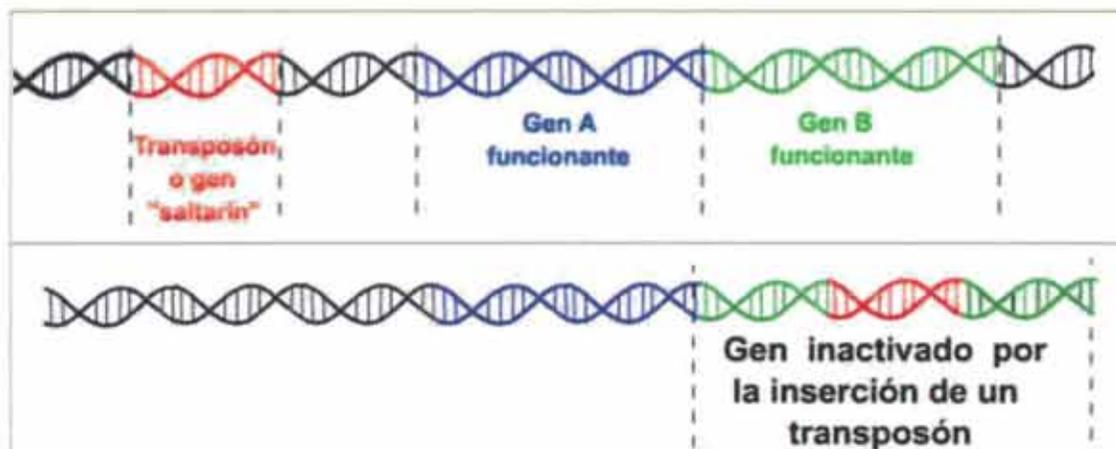


Fig. 19. Esquema del transposón en un sitio de la cadena

(tomada de: http://www.biologia.edu.ar/microgeneral/microianez/27_micro)

Estos llevan genes que codifican una *transposasa*, la enzima requerida para la transposición y se tienen pequeñas repeticiones terminales invertidas en los extremos de su ADN, la longitud de estas varían desde 40 kpb en los elementos más sencillos a más de 1.000 kpb en algunos transposones, cada uno tiene un número específico de pares de bases en sus repeticiones terminales¹.

5. CONJUGACIÓN.

Es un proceso de transferencia de genes entre dos células en contacto, este proceso se inicia cuando el pelo sexual de la célula donante alcanza la envoltura de una célula receptora, el contacto célula-célula se alcanza presumiblemente o por la contracción o por el desensamblaje del pelo sexual, el apareamiento entre las células es inestable en un principio pero luego es específicamente estabilizado mediante ciertas proteínas (Fig.20)

La transferencia de genes mediante conjugación está codificada en ciertos tipos de Plásmidos, los Plásmidos son moléculas circulares (covalentemente cerradas) de ADN extracromosomal que se duplica en forma autónoma, sin embargo, ciertos tipos de éstos pueden integrarse al cromosoma bacteriano y duplicarse como cualquier carácter cromosomal, estos Plásmidos que pueden integrarse se denominan Episomas. Algunos Plásmidos permiten realizar el contacto entre células pero no pueden transferir su ADN, estos Plásmidos son conjugativos pero no movilizables Tra+ mob- (<http://www.microbiología.com.ar/bacteriología/genética.php>)

Otros plásmidos, contrariamente, pueden ser no conjugativos pero movilizables (Tra- mob+), los plásmidos que tienen ambas características, conjugativos y movilizables (Tra+ mob-), se denominan auto-transferibles, los plásmidos no conjugativos pero movilizables pueden ser eficientemente transferidos a células receptoras cuando en la célula donante existen otros plásmidos conjugativos que permiten el contacto célula-célula (<http://www.microbiología.com.ar/bacteriología/genética.php>)

La conjugación se ha estudiado ampliamente en *Escherichia coli* por medio del Factor F que es un Plásmido conjugativo y movilizable de 94.5 kb capaz de integrarse al cromosoma bacteriano, este factor codifica la síntesis y

ensamblaje del pelo sexual, y las funciones que median la transferencia de una copia del Factor F a una célula receptora.

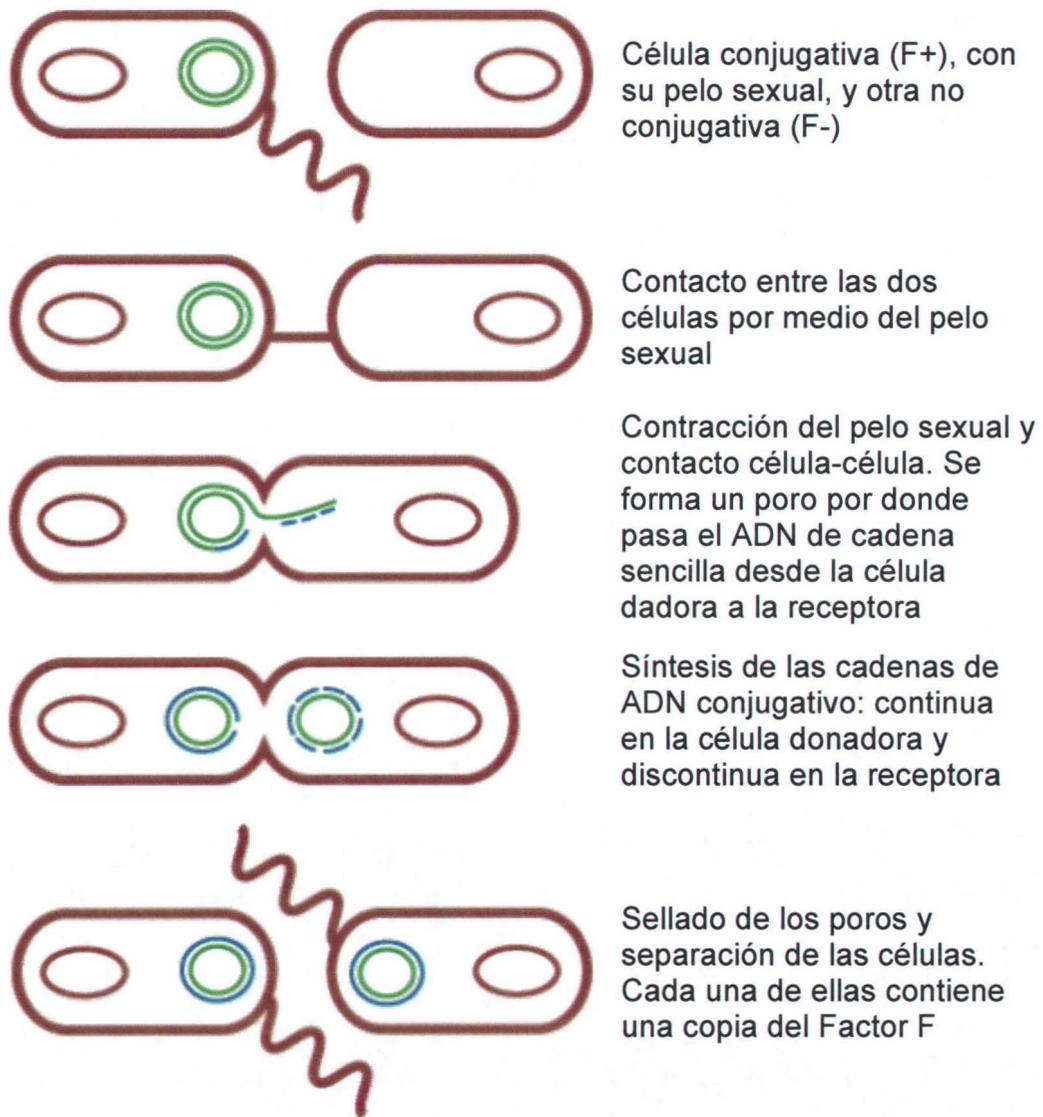


Fig. 20. Pasos de la transferencia de la información genética de una célula F^+ a una F^- .
(tomada de: <http://www.microbiología.com.ar/bacteriología/genética.php>)

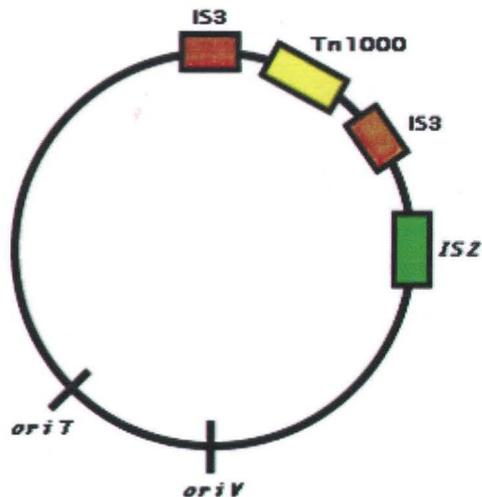


Fig. 21. Esquema de ubicación de *Ori T*
 (tomada de: http://www.biologia.edu.ar/microgeneral/microianez/27_micro)

El Factor F contiene una región de 35 kb que están involucradas en la conjugación y transferencia, esta región contiene al *Ori T* (Fig. 21) que es el sitio en donde se inicia la transferencia de ADN y al menos 28 genes que son designados *Tra* y *Trb* esta región de 35 kb se denomina regulón *Tra*, debido a que los genes *Tram* y *Traj* forman transcritos separados mientras que los restantes genes forman un único operón, el locus (sitio en el genoma) que contiene al *Ori T* se denomina *mob* (Basis of Mobility-bases de movilidad), la presencia del locus *mob* en un Plásmido indica que el Plásmido puede ser transferido a otras células por medio de los productos de los genes *Tra* de otros Plásmidos conjugativos, las células con el locus *mob* son denominadas *mob+*, pero se debe destacar que no todas las células *mob+* pueden ser movilizadas por cualquier Plásmido conjugativo, el pelo sexual *f* es un cilindro hueco de aproximadamente 20 μm de largo, 8 nm de diámetro externo y 2 nm de diámetro interno, que es lo suficientemente grande para el pasaje de una molécula de ADN de cadena sencilla, este pelo está formado por un única subunidad proteica denominada pilina que se encuentra codificada por

el gen *Tra*, la pilina es sintetizada originalmente como un polipéptido de 121 aminoácidos pero aparentemente es convertido, por el producto del gen *Traq*, en un polipéptido funcional de 70 aminoácidos para el ensamblaje de este pelo se requieren al menos 11 genes más el arreglo de las subunidades de pilina en el pelo es similar a la que se halla en la cola de los fagos filamentosos (<http://www.microbiología.com.ar/bacteriología/genética.php>)

El apareamiento efectivo entre dos células donantes es impedido por la exclusión de las superficies, la que requiere de los productos de los genes *Tras* y *Trat* localizados en la membrana citoplasmática y en la membrana externa, respectivamente, aunque el contacto pelo-envoltura puede ocurrir entre dos células donantes, la exclusión de las superficies impide el apareamiento entre dos células donantes, además si bien se puede transferir ADN cuando el pelo *f* se encuentra extendido, generalmente la transferencia de ADN ocurre después del apareamiento célula-célula que es estabilizado por los productos de los genes *Trag* y *Tran*, en cambio, aún se desconoce cómo se desestabiliza el apareamiento y cómo se separan las células

Apareamiento célula-célula que es estabilizado por los productos de los genes *Trag* y *Tran*, en cambio aún se desconoce cómo se desestabiliza el apareamiento y cómo se separan las células.

El Factor F es transferido desde la célula donante hacia la célula receptora en forma de de cadena sencilla lineal con el extremo 5' en primer lugar, cuatro o cinco productos de los genes *Tra* están involucrados en la síntesis del ADN donante conjugativo y algunos eventos deben ocurrir antes que comience la síntesis de este ADN, entre éstos se halla el nickeado (rotura) de una de las cadenas del factor *f* este factor es fracturado en el *Ori T* por el producto del gen *Trai*, y que se mantiene unido al extremo 5' de la cadena cortada. la proteína *Trai*, que junto al producto del gen *Tray* tiene actividad de

Endonucleasa, posee actividad de *Helicasa* y ATPasa, y separa la cadena de ADN conjugante durante la Translocación utilizando ATP, aunque se conoce el sentido en el que es transferido el ADN durante la conjugación, todavía es incierto el rol de ciertas proteínas en el anclaje y protección del ADN, y en la formación de poros en las membranas, se ha propuesto que el ADN de cadena sencilla es protegido durante la transferencia por las Proteínas SSB (single strand-binding proteins) tanto en la célula donante como en la célula receptora, la transferencia del extremo 5' es acompañada por la síntesis continúa de la cadena de ADN complementaria en la célula donante, mientras que en la célula receptora, el ADN de cadena sencilla transferido sirve como base para la síntesis discontinúa de la cadena complementaria

Las células pueden denominarse de diversas maneras en relación al estado en que se encuentra el Factor F dentro de ellas:

Se basa en el intercambio unidireccional de información genética desde una bacteria donante a otra receptora mediante un contacto real, la conjugación se produce en la mayoría de las eucariotas, entre miembros de la misma especie, pero se ha demostrado también entre Procariotas 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 horas, 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 a antibióticos.

5.1. Tipos celulares.

Dentro del intercambio genético a pesar de su naturaleza haploide y de su reproducción asexual, existe en primer lugar un proceso fragmentario que casi nunca implica a los cromosomas completos, en segundo lugar la transferencia del ADN es solamente en una dirección, del donante al receptor y en tercer lugar el mecanismo de transferencia del ADN es especializado, describiéndose de tres tipos:

- 1.- Conjugación, cuando es resultado del contacto de célula a célula.
- 2.- Transducción, mediado por virus.
- 3.- Transformación, en el que participa un ADN libre, aquí la célula donante generalmente se lisa liberando ADN al medio y algunos de estos ADN libres (desnudos) son captados por células receptoras.

5.1.1. Célula F⁺

Estas células contienen al factor f en el citoplasma, este puede ser transferido eficientemente a una célula mediante la conjugación, la transferencia de genes cromosomales ocurre con una muy baja frecuencia cuando el factor f se encuentra en este estado (Fig.22).

5.1.2. Célula F⁻

Estas células no contienen al Factor F y no transfieren ni genes F ni genes bacterianos, son eficientes células receptoras durante la conjugación (Fig. 22).

5.1.3. Célula HFR

Son células que contienen al Factor F integrado al cromosoma, pueden transferir marcadores cromosomales con alta eficiencia desde un punto fijo del cromosoma, generando un gradiente de transferencia de marcadores (Fig. 22)

.

5.1.4. Célula F

Son células que tienen en el citoplasma al Factor F asociado con ciertos segmentos del cromosoma bacteriano, pueden transferir al Factor F y a los segmentos asociados del cromosoma con alta eficiencia y puede mediar la transferencia de genes cromosomales por su integración en regiones homólogas del cromosoma (Fig. 22)

(<http://www.microbiología.com.ar/bacteriología/genética.php>)

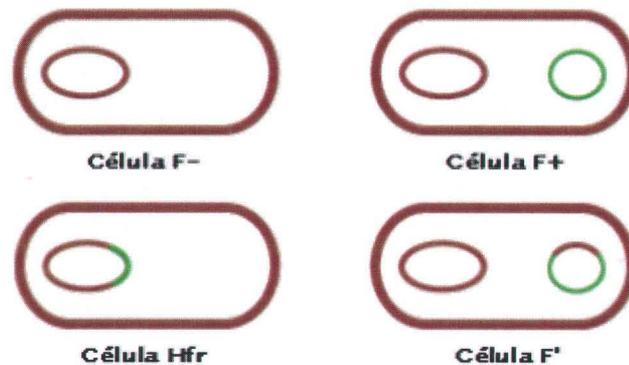


Fig. 22. Esquema de los tipos celulares
(tomada de: <http://www.microbiología.com.ar/bacteriología/genética.php>)

5.2. Plásmido F

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 horas, 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 antibiótica.

5.2.1. Composición.

Plásmido conjugativo ó pelo sexual f es un cilindro hueco de aproximadamente 20 μm de largo, 8 nm de diámetro externo y 2 nm de

diámetro interno, que es lo suficientemente grande para el pasaje de una molécula de ADN de cadena sencilla, este pelo está formado por un única subunidad proteica denominada pilina que se encuentra codificada por el gen *Tra*, la pilina es sintetizada originalmente como un polipéptido de 121 aminoácidos pero aparentemente es convertido, por el producto del gen *Traq*, en un polipéptido funcional de 70 aminoácidos para el ensamblaje de este pelo se requieren al menos 11 genes más el arreglo de las subunidades de pilina en el pelo es similar a la que se halla en la cola de los fagos filamentosos

5.2.2. Función.

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 horas, 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.

5.2.3. Tipos de Plásmidos.

- **Episomas.** Plásmidos que pueden integrarse.
- **Conjugativos no movilizables (Tra+ mob-)** permiten realizar el contacto entre células pero no pueden transferir su ADN,
- **No conjugativos movilizables (Tra- mob+)**, en los plásmidos no conjugativos pero movilizables pueden ser eficientemente transferidos a células receptoras cuando en la célula donante existen otros plásmidos conjugativos que permiten el contacto célula-célula

- **Conjugativos y movilizables** (Tra+ mob+) son plásmidos que tienen ambas características y se denominan auto-transferibles.

La conjugación se ha estudiado ampliamente en *Escherichia coli* por medio del factor f que es un Plásmido conjugativo y movilizable de 94.5 kb capaz de integrarse al cromosoma bacteriano, este factor codifica la síntesis y ensamblaje del pelo sexual, y las funciones.

5.2.4. Proteína SSB

El ADN de doble cadena requiere desenrollarse para que se pueda llevar a cabo la copia de cada una de sus cadenas. la separación de la doble hélice no ocurre de una manera espontánea, ésta es llevada a cabo por dos familias de proteínas: las ADN *helicasa* y las proteínas de unión a ADN de cadena sencilla (Proteínas SSB). las ADN *helicasa*s usan la energía liberada de la hidrólisis del ATP a ADP para promover la separación de las dos cadenas de ADN, las Proteínas SSB se unen a las cadenas de ADN ya separadas por la *helicasa*, evitando que se vuelvan a unir antes de que se adicionen los nucleótidos correspondientes

(<http://www.microbiología.com.ar/bacteriología/genética.php>)

ADN *Topoisomerasas* estas enzimas cambian la extensión y forma de la superhélice del ADN, y proporcionan el giro que permite la propagación continua de la horquilla de replicación.

Las *Topoisomerasas* promueven la separación o la concatenación de los ADN circulares, deshacen los nudos o enredos en el ADN y también participan de una manera esencial en ciertos tipos de recombinación, han sido identificadas dos clases generales de *Topoisomerasas* en una amplia variedad de organismos, las *Topoisomerasas* de tipo I (enzimas de corte-

cierre) que remueven por cada ciclo de reacción un giro del ADN, esta enzima corta una de las dos cadenas de ADN facilitando su rotación hasta que se emparejan ambas cadenas, luego se unen los extremos cortados y con esto queda eliminando un giro de la doble cadena de ADN, en los Procariotes solo deshacen giros negativos mientras que en los Eucariotes la ADN *Topoisomerasas* de tipo I elimina tanto giros negativos como positivos, las ADN *Topoisomerasas* de tipo II remueven giros positivos y negativos en el ADN, pero a diferencia de las de tipo I, catalizan la ruptura transitoria de las dos cadenas de ADN, uniendo posteriormente los segmentos de ADN que han sido cortados, con la ADN *Topoisomerasa* de tipo II en cada ciclo se remueven dos giros negativos o positivos, un tipo especial de ADN *Topoisomerasas* de tipo II que se encuentra en bacterias es la *girasa*, esta enzima remueve un giro positivo de la superhélice de ADN e introduce un giro negativo al ADN de cadena sencilla captado, el cual es protegido de la acción de Endonucleasas por su asociación a Proteínas SSB específicas de la competencia, y forma un complejo de eclipse (www.microbiología.com.ar/bacteriología/genética.php).

5.2.5. Sistema del Operón.

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 una 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 (<http://www.microbiología.com.ar/bacteriología/genética.php>)

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 co-represores (<http://www.microbiología.com.ar/bacteriología/genética.php>)

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 (*trp*), 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 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 (<http://www.microbiología.com.ar/bacteriología/genética.php>)

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 transcritos, puede variar más 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 (<http://www.microbiología.com.ar/bacteriología/genética.php>)

6.- MUTACIÓN.

Como se sabe, 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:

1. El genoma está sujeto a sufrir cambios debidos a mutaciones.
2. 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 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

6.1. Variaciones de la mutación

- Selectivas
- No selectivas
- Puntuales
- Por cambio de sentido
- Silenciosa
- Sin sentido
- Supresoras

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 antibacteriano 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 ejemplo: 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 mas 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 (<http://www.hsa.es/org/dmedica/centrales/ap/docs/biomol>)

Las Delecciones 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.

6.2. Delección.

Son mutaciones en las que se ha eliminado una región de ADN, presentan pérdida de una o más bases, tienen desfases y pueden inactivar un gen, sin embargo las Delecciones pueden implicar la pérdida de centenares o miles de pares de bases, algunas Delecciones son tan grandes que afectan a varios genes, si alguno de los genes es esencial la mutación será letal, tales Delecciones no se pueden restaurar por otras mutaciones sino sólo a través de recombinación genética, de hecho una manera de distinguir las grandes Delecciones de las mutaciones puntuales se basa en distinguir que las últimas son reversibles por otras mutaciones mientras que las primeras no (Fig. 23 y 24).

6.3. Inserción.

Ocurren cuando se añaden nuevas bases al ADN, como las Delecciones, las inserciones pueden deberse a una sola base o a muchas, las microinserciones derivan de errores replicativos, como las Delecciones, pero las inserciones grandes son resultado de errores que ocurren durante la recombinación genética, las inserciones inactivan el gen, muchas de estas mutaciones se deben a la inserción de secuencias específicas de ADN, de 700-1,400 kpb de longitud llamadas secuencias de inserción (Fig. 23 y 24)

6.4. Inversión.

Es una mutación a gran escala que también parece implicar reordenamiento llevados a cabo por errores en la recombinación, los segmentos particulares de ADN resulta invertida respecto al resto del ADN (Fig. 23 y 24)

TIPOS DE MUTACION

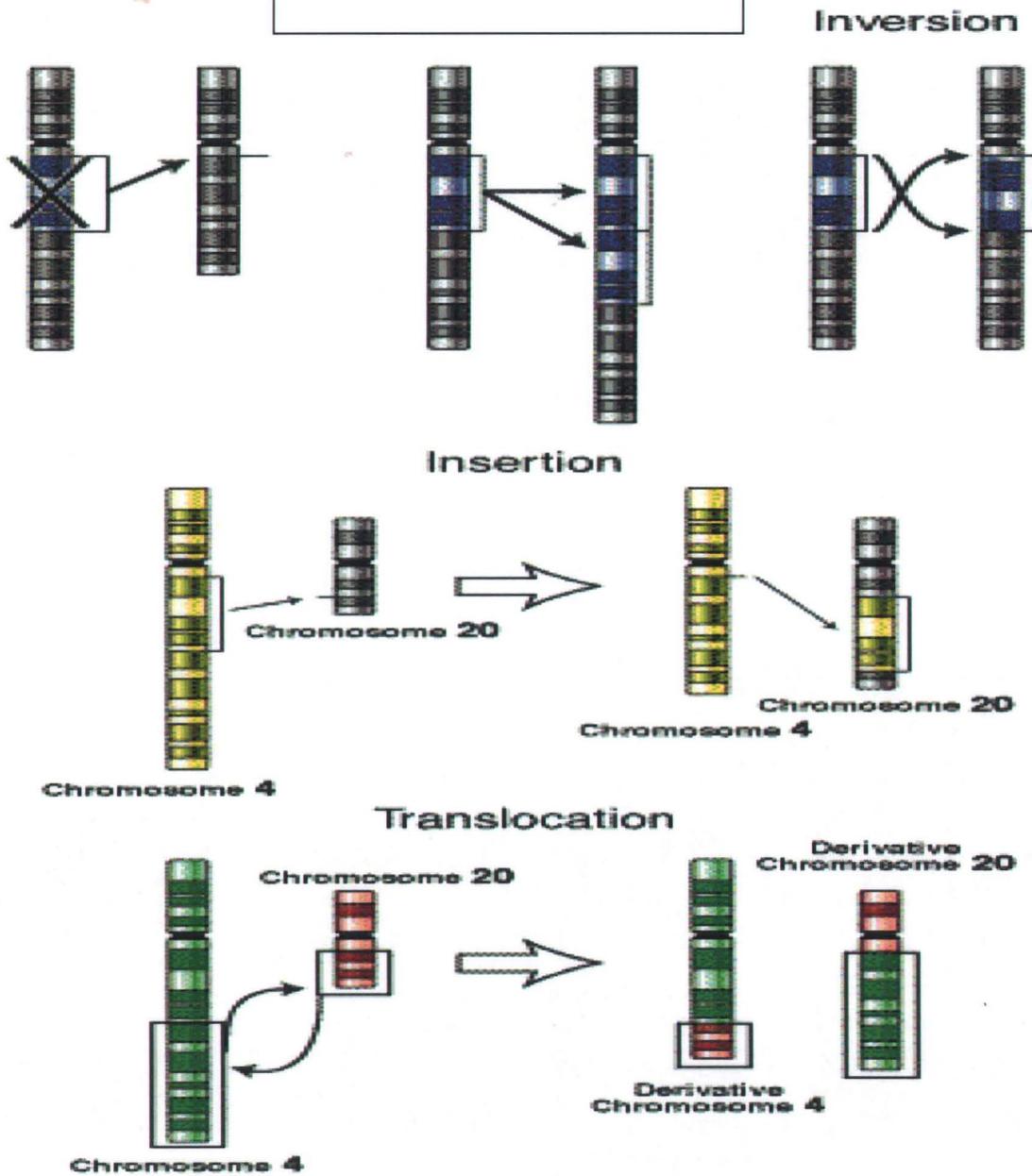


Fig. 23. Tipos de mutaciones
(Tomado de: <http://www.garlandscience.com/ecb/about.html>)

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

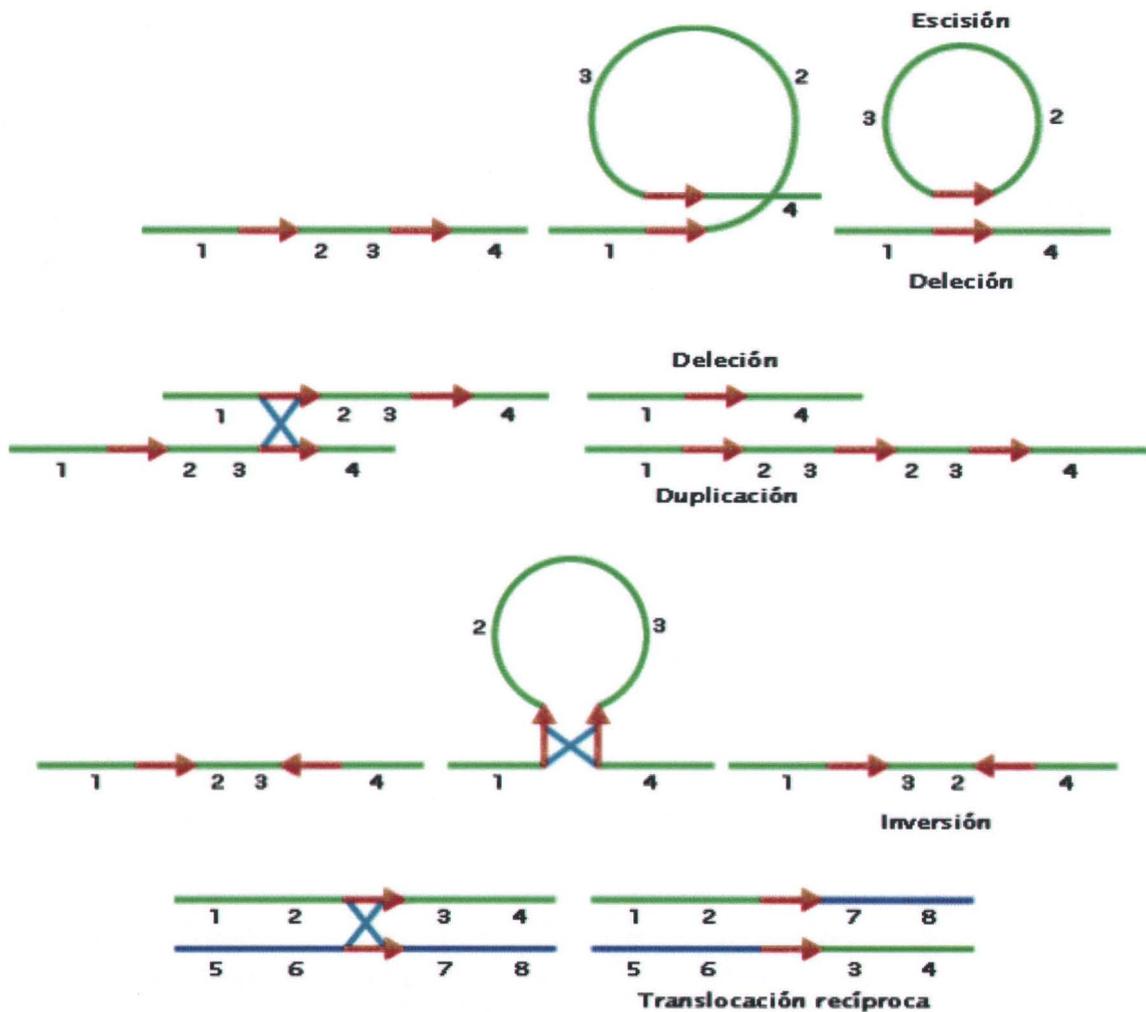


Fig. 24. Mutaciones por delección, inserción e inversión
 (tomado de: http://www.biologia.edu.ar/microgenera/microianez/27_micro)

6.5. Corrida de lectura (“Frameshift”)

Como el código genético se lee desde un extremo en bloques consecutivos de tres bases, cualquier delección o inserción de una base origina un desfase en el marco de lectura y la traducción del gen resulta completamente alterada,

6.6. Traslocación o Transversión.

En esta, largos trozos de ADN se llevan a una nueva localización que también parecen implicar reordenamientos llevados a cabo por errores en la recombinación (<http://www.hsa.es/org/dmedica/centrales/ap/docs/biomol>)

7. RESISTENCIA A LOS ANTIBACTERIANOS.

El problema más grave al cual se enfrentan los profesionales de la salud, es a las cepas multiresistentes a la actual antibiòticoterapia, este hecho que hoy en día se presenta un gran reto que se tiene no solo para los médicos y otros profesionistas del área, sino también para la industria farmacéutica. Por ello es importante conocer cuales son los mecanismos por los que se va creando la resistencia y/o multiresistencia a los fármacos³.

7.1. Plásmido *R*

Como ya se mencionó anteriormente, la transferencia de genes mediante conjugación está codificada en ciertos tipos de Plásmidos, los Plásmidos son moléculas circulares (covalentemente cerradas) de ADN extracromosomal que se duplica en forma autónoma, sin embargo ciertos tipos de éstos pueden integrarse al cromosoma bacteriano y duplicarse como cualquier carácter cromosomal

El plásmido *R* constituye uno de los grupos de plásmidos más extendidos y mejor estudiados, confiere resistencia a los antibiòticos y a otros inhibidores del crecimiento, los plásmidos *R* se descubrieron inicialmente en Japón en cepas de bacterias entéricas que habían adquirido resistencia a varios antibacterianos (resistencia múltiple) y desde entonces se han encontrado en otras partes del mundo, la aparición de bacterias resistentes³.

7.2. Gen *gyr A*

En las cepas Hfr el resultado de la integración del plásmido *f* en el cromosoma, da como resultado la aparición de varios sitios distintos de inserción, es posible el surgimiento de varias cepas Hfr diferentes, una cepa

Hfr donadora siempre cederá los genes en el mismo orden comenzando en la misma posición³.

7.3 Gen *gyr B*

En cepas Hfr de origen independiente transfieren los genes en secuencias diferentes³.

8. INGENIERÍA GENÉTICA

Ingeniería genética, "conjunto de técnicas" que permiten modificar las características de un organismo en un sentido predeterminado mediante la alteración de su material genético, es un término muy amplio que abarca desde la mutagénesis hasta la selección artificial para la mejora de animales o plantas, la ingeniería genética suele utilizarse para conseguir que determinados microorganismos, como bacterias o virus aumenten la síntesis de compuestos, formen compuestos nuevos o se adapten a medios diferentes, así como para la obtención de animales y plantas transgénicos, animales knockout (también llamados KO) que tienen determinados genes inactivados, lo que permite comprobar el efecto que dicha inactivación ejerce sobre el metabolismo, otra aplicación de esta técnica, también denominada técnica de ADN recombinante, incluye la terapia génica, la aportación de un gen funcional a una persona que sufre una anomalía genética⁴.

La "ingeniería" genética consiste en la manipulación del ADN, en este proceso son muy importantes las llamadas enzimas de restricción producidas por varias especies bacterianas. Las enzimas de restricción son capaces de reconocer una secuencia determinada de la cadena de unidades químicas (bases de nucleótidos) que forman la molécula de ADN y romperla en dicha localización. Los fragmentos de ADN así obtenidos se pueden unir utilizando otras enzimas llamadas Ligasas, Por lo tanto las enzimas de restricción y las Ligasas permiten romper y reunir de nuevo los fragmentos de ADN, también son importantes en la manipulación del ADN los llamados vectores, partes de ADN que se pueden autorreplicar (generar copias de ellos mismos) con independencia del ADN de la célula huésped donde crecen, estos vectores generalmente **Plásmidos o virus**, permiten obtener múltiples copias de un fragmento específico de ADN, lo que hace de ellos un recurso útil para producir cantidades suficientes de material con el que trabajar, el proceso de

introducción de un fragmento de ADN en un vector se denomina clonación, ya que se producen copias múltiples de un fragmento específico de ADN. Otra forma de obtener muchas copias idénticas de una parte determinada de ADN es la reacción en cadena de la *polimerasa*, este método es rápido y evita la preparación de genotecas de ADN (clones de ADN) (; Fig. 25)⁴.

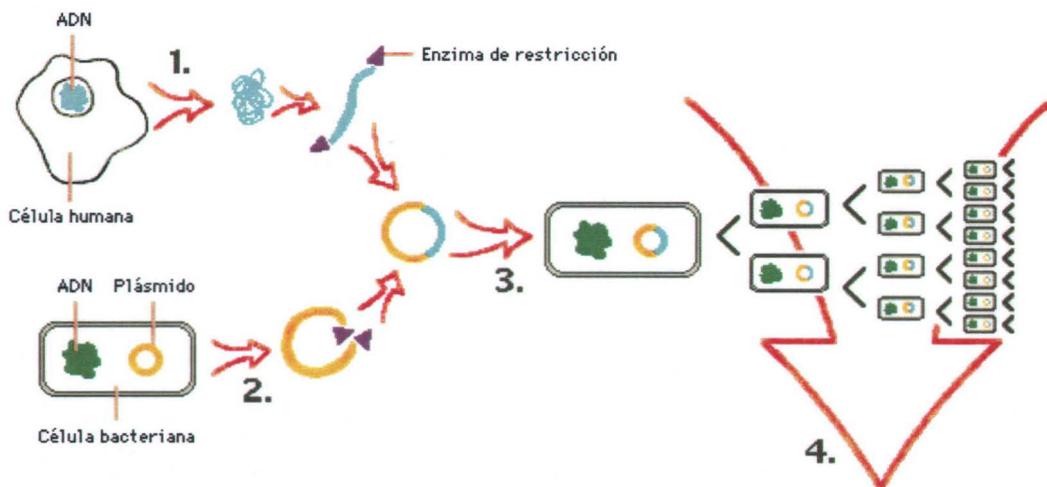


Fig. 25. (Tomado de Enciclopedia Encarta 2005)

La “terapia génica” consiste en la aportación de un gen funcional a las células que carecen de esta función, con el fin de corregir una alteración genética o enfermedad adquirida, la terapia génica se divide en dos categorías, la primera es la alteración de las células germinales, es decir espermatozoides u óvulos, lo que origina un cambio permanente de todo el organismo y generaciones posteriores, esta terapia génica de la línea germinal no se considera en los seres humanos por razones éticas, el segundo tipo de terapia génica, terapia somática celular es similar a un trasplante de órganos. En este caso uno o más tejidos específicos son objeto, mediante tratamiento directo o extirpación del tejido, de la adición de un gen o genes terapéuticos en el laboratorio junto a la reposición de las células tratadas en el paciente.

Se han iniciado diversos ensayos clínicos de terapia genética somática celular destinados al tratamiento de cánceres o enfermedades sanguíneas, hepáticas, o pulmonares⁴.

8.1. Usos y aplicaciones

La “ingeniería” genética tiene numerosas aplicaciones en campos muy diversos, que van desde la medicina hasta la industria, por ejemplo:

- El gen para la insulina, que por lo general sólo se encuentra en los animales superiores, se puede ahora introducir en células bacterianas mediante ingeniería genética, después la bacteria puede reproducirse en grandes cantidades constituyendo una fuente abundante de la llamada insulina recombinante, a un precio relativamente bajo, de esta forma, la producción de insulina no depende del variable suministro de tejido pancreático animal.
- Otra aplicación importante de la ingeniería genética es la fabricación de factor VIII recombinante, el factor de la coagulación ausente en pacientes con hemofilia, casi todos los hemofílicos que recibieron factor VIII antes de la mitad de la década de 1980 han contraído el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) o hepatitis por la contaminación viral de la sangre utilizada para fabricar el producto, desde entonces se realiza la detección selectiva de la presencia de VIH (virus de la inmunodeficiencia humana) y virus de la hepatitis C en los donantes de sangre, y el proceso de fabricación incluye pasos que inactivan estos virus si estuviesen presentes. La posibilidad de la contaminación viral se elimina por completo con el uso de factor VIII recombinante⁴ (Fig. 26).
- Aumento de la resistencia de los cultivos a enfermedades, la producción de compuestos farmacéuticos en la leche de los animales,

la elaboración de vacunas, y la alteración de las características del ganado⁴.

- Obtención de organismos transgénicos, en los que se han introducido determinados genes de interés.
- La clonación, que supone la extracción del núcleo de un óvulo para sustituirlo por el núcleo de otro animal de la misma especie, después, ese óvulo se implanta en el útero de otro animal y, de esta manera, se obtiene un animal genéticamente idéntico al organismo del que se había obtenido el núcleo original, en febrero de 1997, se hizo pública la noticia de que había sido clonado el primer mamífero adulto: una oveja, a la que bautizaron con el nombre de Dolly, este descubrimiento, que supuso una auténtica revolución biotecnológica, planteó una gran controversia mundial por sus implicaciones legales, morales y éticas.

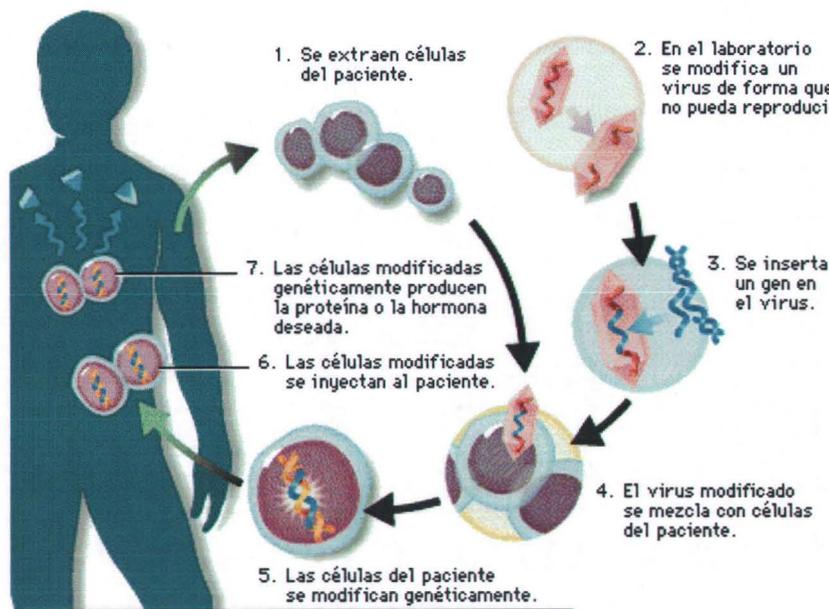


Fig. 26 (Tomado de Enciclopedia Encarta 2005)

Mientras que “los beneficios potenciales de la ingeniería genética” son considerables, también lo son sus riesgos, ya que muchas veces se emplean como vectores microorganismos infecciosos como los virus, por ejemplo, la introducción de genes que producen cáncer en un microorganismo infeccioso común, como el virus influenza, causante de la gripe, podría ser muy peligrosa, por consiguiente, en la mayoría de las naciones, los experimentos con ADN recombinante están bajo control estricto, y los que implican el uso de agentes infecciosos sólo se permiten en condiciones muy restringidas. Otro problema es que, a pesar de los rigurosos controles, es posible que se produzca algún efecto imprevisto como resultado de la manipulación genética, de hecho, algunos grupos ecologistas han manifestado su desconfianza sobre los cultivos de plantas transgénicas ante el temor de que estos nuevos genes pudieran resultar perjudiciales para la salud humana, indujeran respuestas alérgicas o incluso pudieran llegar a introducirse en especies vegetales relacionadas⁴.

III. CONCLUSIONES.

El conocimiento de los mecanismos moleculares existentes en las diversas especies útiles y patógenas para el hombre, ha redituado en logros en todos los campos de la biología;

- En la producción y mejoramiento de elementos necesarios para la supervivencia de la raza humana.
- En el control y erradicación de muchas enfermedades.
- Entendimiento de varios de los procesos vitales para las células, la interacción de dos de las biomoléculas más importantes para su supervivencia: las proteínas y el ADN.
- Es necesario ahondar todavía más en el entendimiento y descripción de la interacción de las proteínas y el ADN, sobre todo dentro de organismos que sean de interés para el desarrollo económico del hombre, o que presenten una amenaza para sus planes de salud.

IV GLOSARIO:

ADN.- Ácido desoxirribonucleico, el material hereditario de las células y algunos virus.

ADN POLIMERASA.- Una enzima que sintetiza una nueva cadena de ADN en la dirección 5' a 3' utilizando una antiparalela como molde.

ANTICODÓN.- Una secuencia de tres bases en el ARNt que se empareja con un codón durante la síntesis de proteínas.

ANTIPARALELO.- En relación con el ADN bicatenario o de doble cadena, una que va en dirección 5' a 3' y la otra que va en la dirección 3' a 5'.

ARN.- Ácido ribonucleico, implicado en la síntesis de proteínas como ARN mensajero, ARN de transferencia y ARN ribosómico.

ARN POLIMERASA.- Una enzima que cataliza la síntesis ARN en dirección 5' a 3' utilizando una cadena antiparalela de ADN como molde.

BACTERIA.- Un grupo de procariotas filogenéticamente relacionados y distinto del grupo Archaea.

CÉLULA.- La unidad fundamental de la materia viva.

CODÓN.- Una secuencia de tres bases en el ARNm que codifica un aminoácido.

CONJUGACIÓN.- Transferencia de genes de una célula procariótica a otra por un mecanismo que incluye contacto célula a célula y un plásmido.

CROMOSOMA.- Una molécula de ADN que en procariotas es circular en general pero lineal en eucariotas, que porta los genes esenciales para las funciones celulares.

ENLACE COVALENTE.- Unión química en la que los electrones se comparten entre dos átomos.

ENLACE FOSFODIESTER.- Tipo de unión covalente entre nucleótidos de un polinucleótido.

ENZIMAS.- Una proteína que tiene la capacidad de acelerar catalizar una reacción química específica.

FENOTIPO.- Las características observables de un organismo

GEN.- Un segmento de ADN que codifica una proteína vía ARNm, un ARNt o un ARNr.

GENOMA.- Todos los genes contenidos en una célula o virus.

GENOTIPO.- La constitución genética precisa de un organismo.

INICIADOR.- Una molécula normalmente un polinucleótido al que se le une el ADN polimerasa para unir el primer desoxirribonucleótido durante el proceso de replicación del ADN.

LISOGÉNICA.- Bacteria que contiene un profago.

MUTACIÓN.- Cambio heredable en la secuencia de nucleótidos (bases) del ADN (genoma) de un organismo.

NUCLEOTIDO.- Monómero de un ácido nucleico conteniendo una base nitrogenada adenina, guanina, citosina, timina o uracilo, una molécula de fosfato y un azúcar, ribosa en el ARN o deoxirribosa en el ADN.

OPERÓN.- Un grupo de genes cuya expresión esta controlada por un único operador.

PLÁSMIDO.- Elemento genético extracromosomal que no tiene forma extracelular.

PROMOTOR. Una región del ADN a la que puede unirse el ARN polimerasa para comenzar la transcripción.

PROTEÍNA ACTIVADORA.- Es una proteína reguladora que se une específicamente a sitios del ADN y estimula la Transcripción.

PROTEÍNA REPRESORA.- Es una proteína reguladora que se une a sitios específicos y que bloquean la Transcripción.

REPLICACION. Síntesis de ADN utilizando otro ADN como molde.

REPLICACION SEMICONSERVATIVA. Síntesis de ADN que da lugar a dos nuevas hélices bicatenarias, cada una de ellas tiene una vieja cadena llamada parental y otra nueva llamada progeñie.

TRADUCCIÓN.- Síntesis de proteínas usando la información genética del ARN como molde.

TRANSCRIPCIÓN.- Síntesis de ARN usando ADN como molde.

TRADUCCIÓN.- Síntesis de proteínas usando la información genética del ARN como molde.

TRANSDUCCIÓN.- Transferencia de genes del hospedador de una célula a otra por un virus.

TRANSPOSÓN.- Tipo de elemento transponible que lleva genes adicionales a los implicados en la transposición.

V. BIBLIOGRAFÍA:

- 1.- Liebana Ureña J. Microbiología Oral. Editorial Mc Graw Hil-Interamericana 1997, 2ª edición
- 2.- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff Martin, Roberts K, Watson James D. Biología Molecular de La Célula, editorial Ediciones Omega, S.A., 1996, tercera edición.
- 3.- Michael T. Madigan. BROCK Biología de los Microorganismos, editorial PRENTICE HALL, octava edición 1998.
- 4.- Enciclopedia Encarta 2005.

Complemento:

1. - (<http://www.hsa.es/org/dmedica/centrales/ap/docs/biomol>)
2. - (<http://www.garlandscience.com/ecb/about.html>)
3. - (<http://www.microbiologia.com.ar/bacteriologia/genetica.php>)
- 4.- (http://www.biologia.edu.ar/microgeneral/microianez/27_micro)