

00544 2



204-

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE QUIMICA

**DESOXIRIBONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN;
POLIMERASAS TERMOESTABLES
Y SU IMPORTANCIA ACTUAL**

para obtener el DIPLOMA de
ESPECIALIDAD EN BIOQUIMICA CLINICA

Q.F.B. MERCEDES EDNA GARCIA CRUZ

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Cd. Universitaria, D.F., 1998

269082



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**DESOXIRRIBONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN;
POLIMERASAS TERMOESTABLES Y SU
IMPORTANCIA ACTUAL**

TESINA

para la obtención del DIPLOMA de

ESPECIALISTA EN BIOQUÍMICA CLÍNICA

PRESENTA

Q.F.B. MERCEDES EDNA GARCIA CRUZ

1998

Asesor del tema: DR. ALEJANDRO CRAVIOTO
Lugar de realización: FACULTAD DE QUIMICA, U.N.A.M.

JURADO CALIFICADOR

Presidente: DRA. YOLANDA LOPEZ VIDAL
Primer vocal: DRA. MA. TERESA TUSIE HERNANDEZ
Secretario: DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA
Primer Suplente: DR. CARLOS ESLAVA CAMPOS
Segundo suplente: M. en C. BISERKA SVESHTAROVA
PEKARKOVA

Agradecimientos

Al Dr. Alejandro Cravioto, gracias por haberme dado la oportunidad de realizar la especialidad impartida por usted y la presente tesis no hubiera sido posible sin su dirección, lo más seguro me faltarían palabras para vertir mi más profundo agradecimiento. Gracias por su comprensión, confianza y paciencia que ha depositado en mí, por su amistad, su visión prospectiva, su apoyo incondicional, su dedicación dinámica, su sensibilidad alentadora, su valioso tiempo dedicado para la culminación de este trabajo, pero sobre todo gracias por su calidad humana.

Al Dr. Carlos Eslava por su amistad, su paciencia y apoyo que me ha brindado con gran esmero para la elaboración de este trabajo.

A los Dres. Yolanda López Vidal, Ma. Teresa Tusie Hernández, Alejandro Zentella y M. en C. Biserka Sveshtarova Pekarkova por sus valiosas aportaciones reflejadas en la culminación de este trabajo.

IN MEMORIA

Al Dr. Joaquin Cravioto, por haberme abierto las puertas del Instituto Nacional de Ciencias y Tecnologías del DIF donde recibí la mejor instrucción académica fortaleciendo todos mis conocimientos adquiridos así como haberme dado la oportunidad de adquirir el adiestramiento en las tecnologías innovadoras durante su administración y poder realizar esta especialidad. Por su paciencia y confianza, y ahora en un humilde y sencillo homenaje póstumo continuará este agradecimiento siguiendo sus consejos acertados que siguen vivos en mí. Gracias Dr. Joaquín Cravioto.

A la Dra. Virginia Vázquez Alvarado, quién se esmeró en mi formación académica para realizar la especialidad, espero que este agradecimiento póstumo sea la continuidad del que le manifesté en vida, nuevamente gracias.

A TI, RAY

por tu amor, cariño, paciencia, apoyo y las enseñanzas que me has brindado y compartido en algunos momentos difíciles y otros de gran alegría y regocijo en ésta y en otras etapas realizadas en mi vida y las que faltan por realizar.

A MIS HIJOS

Abril Schaddai y Raúl José Elohim "mis morusitos", por haber llegado a mi vida en los momentos más increíbles que pudiera haber soñado en mi vida y estar viviendo esta realidad que gracias a Dios ahora puedo compartir con ustedes al haber concluido una etapa más en mi formación académica.

A MIS PADRES

José Santos y Mercedes

Por haberme dado la vida, el apoyo y confianza que siempre me han brindado y depositaron en mi.

A MIS HERMANOS

Edgardo Denis, José Santos, Plinio Raúl, Virgilio René, Jorge Augusto y Lizandro Diego, por contar siempre con su apoyo cuando los he necesitado.

INDICE

	Página
INTRODUCCION	7
ANTECEDENTES HISTORICOS	9
ESTRUCTURA DEL ADN	10
DEFINICION DE DNasa	12
METODOLOGIA PARA LA DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE DNasa BACTERIANA	21
ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN	31
POLIMERASAS TERMOESTABLES	37
IMPORTANCIA ACTUAL DE LAS DNasas	41
DISCUSION	51
CONCLUSIONES	59
BIBLIOGRAFIA	61

INTRODUCCION

La esperanza de descubrir el origen de las enfermedades y comprender el propio origen de la vida, la medicina y la química han evolucionando hasta conocer la estructura del ADN en 1962, logrando tener a su alcance el misterio de la vida (1).

Han transcurrido dos décadas desde que los químicos comenzaron a intuir que la maquinaria del funcionamiento celular no es una fuerza misteriosa, sino el minucioso trabajo de las moléculas de un sinnúmero de diferentes sustancias celulares. Aunque en un principio fueron escasos los avances realizados en el estudio de este microcosmos, con el tiempo fueron más frecuentes: hoy, ninguna otra disciplina científica crece a un ritmo tan frenético como la biología molecular (1).

No fue hasta mediados de los años setenta cuando los investigadores aprendieron a cortar el material hereditario de forma precisa, manipulada y controlada. Esto fue posible gracias al aislamiento de las polimerasas termosensibles, polimerasas termoestables y las endonucleasas de restricción, que son enzimas capaces, de reconocer una pequeña secuencia de bases y, de producir una ruptura en puntos específicos de la cadena de ADN. Cada una de estas "tijeras" moleculares puede reconocer una secuencia concreta de base: la

endonucleasa Eco RI, reconoce siempre el fragmento de ADN formado por la secuencia de bases GAATT; la Hind III, el fragmento AAGCTT; la PSt I, el fragmento CTGCAG y así sucesivamente. A partir de entonces fue posible preparar de manera reproducible fragmentos del ADN sometido a estudio. Además, el uso de ligasas, enzimas cuya función es reparar los cortes ocasionados en su momento, por las enzimas responsables de fragmentar el ADN. Así la combinación de estas enzimas nos permite actualmente separar y reunir los fragmentos de ADN a voluntad (1).

Los experimentos "históricos" sobre la reacción en cadena de polimerasas (PCR), con el fragmento termolábil Klenow de I a Poll o de la T4 DNA polimerasa, estos tuvieron la desventaja de que la enzima nueva tenía que ser agregada a la mezcla de reacción después de cada ciclo de desnaturalización (1987-1988). La identificación de DNA polimerasas termoestables hizo posible realizar *in vitro* la amplificación de ADN, sin agregar enzima después de cada ciclo. Las polimerasas termoestables, solamente pierden moderadamente actividad cuando alcanzan temperaturas de desnaturalización (>93 °C) (1988) (36).

Gracias a la ingeniería genética, hoy resulta más fácil encontrar y descodificar genes que estudian directamente la estructura de una proteína. Así, una vez que se ha aislado un gen, los biólogos pueden utilizar la técnica de ADN recombinante para fabricar la proteína de interés en la cantidad que se desee. Esto se consigue implantando el gen elegido en el material genético de una bacteria con el objeto

de convertirlas en diminutas fábricas de la proteína que nos interesa. El ADN contiene además de los genes, unos fragmentos que regulan la formación de nuevas moléculas proteínicas. Actualmente los investigadores no se conforman con sólo conocer la estructura y la función de las diferentes secuencias del ADN, ahora ya fabrican pequeños tramos de ADN para construir genes artificiales u oligonucleótidos que nos ayuden a reconocer algunas secuencias del ADN (1).

ANTECEDENTES HISTORICOS

Para la identificación de una bacteria se analizaban una serie de características metabólicas descritas por un grupo de expertos, quienes utilizando diferentes sustratos han establecido patrones de identidad para cada bacteria (1). Existen otros procedimientos para este mismo fin tales como la tipificación serológica, la relación guanina-citosina e incluso los más actualizados que se basan en el reconocimiento de secuencias específicas de ADN por medio de técnicas de biología molecular. Entre estas, la hidrólisis de ácido desoxirribonucleico (ADN) por acción de enzimas específicas, también fue utilizada como un procedimiento para la identificación de microorganismos (2).

de convertirlas en diminutas fábricas de la proteína que nos interesa. El ADN contiene además de los genes, unos fragmentos que regulan la formación de nuevas moléculas proteínicas. Actualmente los investigadores no se conforman con sólo conocer la estructura y la función de las diferentes secuencias del ADN, ahora ya fabrican pequeños tramos de ADN para construir genes artificiales u oligonucleótidos que nos ayuden a reconocer algunas secuencias del ADN (1).

ANTECEDENTES HISTORICOS

Para la identificación de una bacteria se analizaban una serie de características metabólicas descritas por un grupo de expertos, quienes utilizando diferentes sustratos han establecido patrones de identidad para cada bacteria (1). Existen otros procedimientos para este mismo fin tales como la tipificación serológica, la relación guanina-citosina e incluso los más actualizados que se basan en el reconocimiento de secuencias específicas de ADN por medio de técnicas de biología molecular. Entre estas, la hidrólisis de ácido desoxirribonucleico (ADN) por acción de enzimas específicas, también fue utilizada como un procedimiento para la identificación de microorganismos (2).

En 1927, la capacidad de los microorganismos para obtener ácido fosfórico inorgánico a partir del ácido nucleico, fue relacionada con la actividad de una nucleasa. Esta misma actividad se observó anteriormente en levaduras (1900), en hongos como *Penicillium glaucum* y *Aspergillus niger*, (1903) y en bacterias como *Bacillus coli* (1904), *Bacillus proteus* (1938) y *Staphylococcus* (1914) (3).

Con la finalidad de determinar la importancia del uso de las desoxirribonucleasas en la expresión génica y el manejo de éstas para la búsqueda de mutaciones, así como la expresión amplificada de secuencias de ADN para mapeo cromosómico, nos adentraremos en el mundo de la biología molecular.

ESTRUCTURA DEL ADN

El ácido desoxirribonucleico (ADN) está constituido de unidades monoméricas llamadas nucleótidos, constituidos de las llamadas bases púricas y pirimídicas (adenina, timina, guanina, citosina y uracilo), desoxirribosa y fosfato, estas se polimerizan formando puentes 3'5' diéster de fosfato. En la naturaleza el ADN existe en forma de dobles cadenas unidas y estabilizadas por puentes de hidrógeno entre las bases nucleicas (dos puentes de hidrógeno entre adenina y timina, y tres puentes entre guanina y citosina). El conformero más estable es el que se designa como B, con 3.4 Å entre cada base y 34 Å por vuelta. Con base

En 1927, la capacidad de los microorganismos para obtener ácido fosfórico inorgánico a partir del ácido nucleico, fue relacionada con la actividad de una nucleasa. Esta misma actividad se observó anteriormente en levaduras (1900), en hongos como *Penicillium glaucum* y *Aspergillus niger*, (1903) y en bacterias como *Bacillus coli* (1904), *Bacillus proteus* (1938) y *Staphylococcus* (1914) (3).

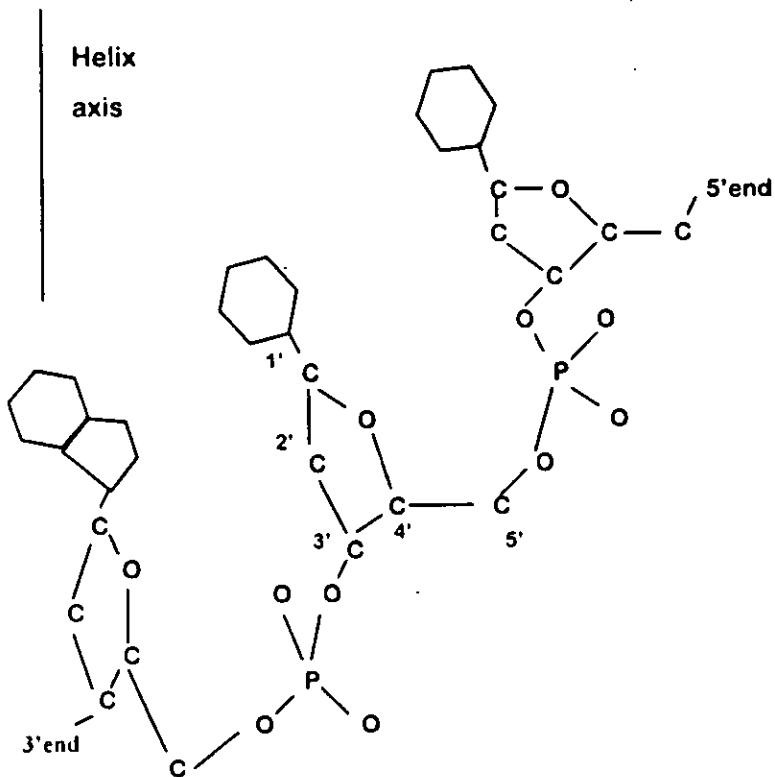
Con la finalidad de determinar la importancia del uso de las desoxirribonucleasas en la expresión génica y el manejo de éstas para la búsqueda de mutaciones, así como la expresión amplificada de secuencias de ADN para mapeo cromosómico, nos adentraremos en el mundo de la biología molecular.

ESTRUCTURA DEL ADN

El ácido desoxirribonucleico (ADN) está constituido de unidades monoméricas llamadas nucleótidos, constituidos de las llamadas bases púricas y pirimídicas (adenina, timina, guanina, citosina y uracilo), desoxirribosa y fosfato, estas se polimerizan formando puentes 3'5' diéster de fosfato. En la naturaleza el ADN existe en forma de dobles cadenas unidas y estabilizadas por puentes de hidrógeno entre las bases nucleicas (dos puentes de hidrógeno entre adenina y timina, y tres puentes entre guanina y citosina). El conformero más estable es el que se designa como B, con 3.4 Å entre cada base y 34 Å por vuelta. Con base

en la proporción de bases, hay dos tipos de ADN, aquel en el que predominan las bases adenina y timina como el encontrado en tejido animal y levaduras; y en el que la guanina y la citosina se encuentran en mayor proporción como en las bacterias y virus. Ambas cadenas son antiparalelas, es decir, que una de estas tiene dirección 5'3' y la otra 3'5'(4).

Figura 1. Estructura helicoidal del ADN, mostrando sus uniones de diéster de fosfato, la orientación de la desoxirribosa que es necesariamente paralela al eje de las equis y perpendicular al plano en el que se orientan las bases, y las bases nucleicas.

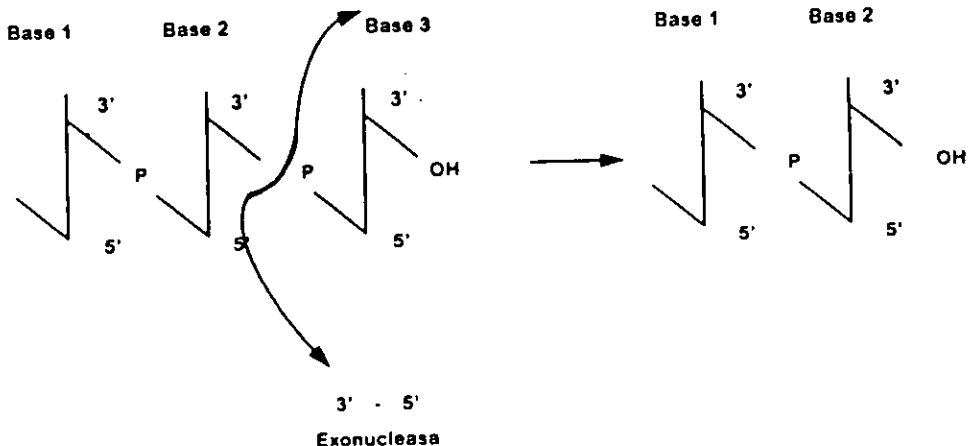


Fuente: Genetics and Molecular Biology. Ed. Johns Hopkins. 2th Ed. pp 22. 1993

DEFINICION DE DNasa

A las proteínas con actividad para digerir ADN se les denominó desoxirribonucleasas (DNasas) las cuales se clasificaron por los tipos de enlaces que hidrolizaban. Teniéndose por un lado las **endonucleasas** que rompen los enlaces diéster de fosfato internos, produciendo residuos 3'-hidroxil, 5'-fosforil ó 5'-hidroxil, 3'-fosforil terminales, frente a determinadas secuencias de nucleótidos; y por otra a las **exonucleasas** que hidrolizan los nucleótidos sólo cuando están presentes al final de la molécula. Algunas nucleasas rompen ambas cadenas y otras solamente rompen una de las cadenas del ácido nucleico (5).

Figura 2. La remoción exonucleolítica del nucleótido 3' final de una cadena de ADN con dirección 5'a 3', muestra la actividad de una enzima exonucleolítica 3'-5' la cual genera un 3'-OH final.



Fuente: Genetics and Molecular Biology. Ed. Johns Hopkins. 2th Ed. pp 22. 1993

Las DNAsas tienen características diferentes dependiendo de su origen, la técnica empleada para su extracción y purificación, así como por los requerimientos especiales de cada una de ellas para una actividad óptima como son: pH, tipo de sustrato sobre el que puede actuar y el requerimiento de cationes. Las DNAsas son capaces de degradar aproximadamente la cuarta parte de los enlaces diéster de fosfato internos o las uniones por puentes de hidrógeno que mantienen las secuencias complementarias de nucleótidos del ADN, produciendo una mezcla de oligonucleótidos. Para determinar la degradación del ADN se recurre al cambio en sus propiedades físicas que incluyen: la disminución en la viscosidad de la solución del ADN o el aumento en la absorción específica de la luz ultravioleta a 260 nm, cambio debido a la formación de un mayor porcentaje de purinas libres en los oligonucleótidos obtenidos después de la degradación (5).

Las DNAsas son producidas por diferentes microorganismos, su función en una bacteria consiste en romper el ADN de microorganismos diferentes, al que las produjo, que se encuentre invadiendo su nicho ecológico, esto ha permitido vislumbrar la especificidad de huésped de estas proteínas.

Las DNAsas están presentes en extractos de una gran variedad de microorganismos, sin embargo las de tipo extracelular sólo se han reportado en pocas especies bacterianas entre las que se incluyen: *Staphylococcus aureus*, el

grupo A de *Streptococcus*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Sacillus spp.*, *Vibrio spp* (5) y *Clostridium septicum* (6).

En las etapas tempranas del conocimiento de estas enzimas por su especificidad fueron consideradas como buenos candidatos para la caracterización de microorganismos. En la actualidad, aunque se utilizan para estos propósitos, su uso más difundido se relaciona con la caracterización molecular de secuencias de ADN (6).

A continuación se presentan algunas de las enzimas de restricción que se han descrito por los investigadores que las aislaron.

McFadyen (3) en 1934, demostró en *Bacillus mesentericus vulgatus*, *Bacillus megaterium* y *Bacillus subtilis* la presencia de una nucleasa que actúa sobre el ADN obtenido de levaduras, a un pH óptimo de 6.6. Los resultados mostraron sin embargo, una actividad hidrolítica únicamente sobre ADN y no sobre ARN.

En 1965 Kerr y cols. (7), reportaron la presencia de una nucleasa extracelular dependiente de Ca^{++} aislada de *Bacillus subtilis*. Esta enzima intervenía en la degradación exonucleolítica de ADN desnaturalizado por calor comenzando por el extremo 5'-final de la molécula. Okasaki y cols. en 1966 (7), describieron una nucleasa con actividad similar pero físicamente distinta obtenida de *B. subtilis* que

también cataliza la degradación exonucleolítica de ADN desnaturalizado; a diferencia de la anterior esta enzima actúa a partir de la porción 5' como de la 3'-terminal. La nucleasa es dependiente de Ca^{++} y degrada el ácido desoxirribonucleico tanto en forma nativa de conformero B como desnaturalizada así como al ácido ribonucleico (ARN) a nucleósidos 3'-monofosfato, la enzima fue estable aún después de almacenarse en congelación.

En 1948, Tillet y cols. (6), y McCarty (8) demostraron que microorganismos del género *Streptococcus* de los grupos A, B y C liberan ribonucleasas (RNasas) y DNasa en un medio de cultivo empleado para despolimerizar ácidos nucleicos. Estas enzimas son por lo menos cuatro y han sido designadas como A, B, C y D, todas antigénicamente diferentes. Las nucleasas denominadas A y C resultaron específicas para sustratos que contenían desoxirribosa y no atacaban ARN. Las nucleasas B y D hidrolizaban las uniones diéster de fosfato tanto de ADN como de ARN (9).

Al igual que otras enzimas que actuaban sobre ADN, las nucleasas de *Streptococcus* requieren de cationes divalentes para su activación, la presencia de los cationes Ca^{++} y Mg^{++} , al parecer tienen mayor efecto sobre la activación de la enzima, sin embargo también otros cationes divalentes afectan su actividad. Por ejemplo, se ha observado que el sitio de acción de una cadena de polinucleótido se altera por el uso de diferentes cationes activadores (9, 10).

Cunningham y cols. en 1956 (11), aislaron por primera vez la DNasa de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* ambos microorganismos producen una DNasa extracelular; sin embargo *Staphylococcus aureus* la elabora en mayor cantidad. Esta enzima es una nucleasa 3'-nucleótido hidrolasa (desoxirribonucleasa), que difiere de otras DNasas que requiere Ca^{++} como ion activador (cofactor) y un pH óptimo de 8.6 a 9.0, además de ser marcadamente estable al calor (100 °C por 15 min), al realizar su caracterización se observó que su actividad de cierta manera se presentaba junto con la presencia de la coagulasa (5).

La hidrólisis de ADN por la nucleasa estafilocócica produce inicialmente fragmentos de mono- y dinucleótidos al producirse la ruptura específica de las uniones entre el carbono 5' del residuo del azúcar fosfato, que se encuentra unido al extremo final del carbono 3' del residuo de azúcar fosfato adyacente. Los oligonucleótidos que contienen residuos de ácidos adenílicos y timidílicos son rotos preferentemente y la DNasa es más activa sobre ADN desnaturalizado que nativo (5).

La nucleasa de estafilococo ha sido la mejor caracterizada, tiene un peso molecular de 16,000 kD, es de naturaleza proteica y está constituida por un polipéptido que contiene 149 aminoácidos. La molécula no contiene puentes

disulfuro y aparece como relativamente flexible, esto es dependiente de tres residuos de tirosina que están incluidos en el sitio activo (12).

Fusillo y Weiss (13) en 1959 investigaron los requerimientos de timina y nicotinamida sobre el desarrollo de *Staphylococcus sp.*, así como el requerimiento de Ca^{++} para la síntesis de la enzima. Por otro lado, determinaron que el EDTA y la tetraciclina no influyen en la producción de la misma, y que el agar soya tripticasa-ADN en presencia de una atmósfera aeróbica favorece la producción de la enzima.

La despolimerización de ADN de timo de ternera por una cepa de *Pseudomonas sp.* fue reportada por Catlin en 1956 (14). En 1961, Guschlbauer y Halleck, encontraron que *Pseudomonas aeruginosa* producía DNAsas extra e intracelulares que diferían en su pH óptimo así como en sus requerimientos de activadores (6). Streitfeld y cols. (14) determinaron la actividad extracelular de desoxirribonucleasa en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* y *Pseudomonas fluorescens*, sin embargo estos autores sólo señalaron la necesidad de la presencia de Ca^{++} para su actividad (5, 14, 15).

Messinova y cols. (6) en 1958, describieron la presencia de ribonucleasa en el caldo de cultivo de *Corynebacterium diphtheriae* PW-8. La enzima se estudió principalmente con el objeto de establecer si existía relación entre su expresión y

la producción de la toxina característica de esta bacteria, los autores concluyeron que la DNasa es liberada por la bacteria durante la fase de crecimiento activo y que la producción de la misma se relaciona con la virulencia, ya que fue una característica constante de todas las cepas toxigénicas.

En 1960 Lehman (16), mencionó que varias enzimas presentes en extractos libres de células de cultivos de *Escherichia coli* podían degradar ADN y pequeños polinucleótidos. Una de las enzimas era una fosfodiesterasa que hidrolizaba el ADN de *E. coli* y del timo de ternera previamente tratados por calentamiento.

Posteriormente en 1962, los mismos autores (17) identificaron una endonucleasa que actuaba sobre múltiples puntos de ADN nativo de doble cadena cuyos productos de hidrólisis eran mayores a pentanucleótidos. La enzima purificada requirió para su actividad la presencia de Mg^{++} que puede ser sustituido por Mn^{++} , pero no por Ca^{++} y Zn^{++} . El pH óptimo para su actividad era de 7.5 a 8.5 (17).

Eaves y Jeffries en 1963 (18) aislaron una nucleasa extracelular de *Serratia marcescens* empleando cromatografía de intercambio catiónico en dietil-amino-etil-Sephadex, esta se clasificó como una fosfodiesterasa no específica debido a que podía actuar contra ADN y ARN. La nucleasa requería de la presencia de Mg^{++} el cual resultó ser esencial para su actividad, el pH óptimo para tal actividad

fue de 6.8 y es inactivada completamente por el calentamiento a 50° C durante 15 minutos (18). Nestle y Roberts en 1969 (20, 21), confirmaron que se trataba de una enzima extracelular, cuya producción alcanzaba su máximo antes de la fase estacionaria del crecimiento bacteriano, los productos de degradación que producían eran di-, tri- y tetranucleótidos terminados en 5'-fosfato.

En 1967, Berry y Campbell (22) describen una nucleasa extracelular de *Micrococcus sodonensis*, que es exonucleolítica, degradaba ADN nativo y desnaturalizado, era termolábil, aún en presencia de Ca^{++} y requería Mg^{++} y Mn^{++} para su activación. El pH óptimo para su actividad semejante a la nucleasa estafilocócica. Esta enzima actúa eficazmente sobre polímeros sintéticos como el poli-A y sobre réplicas de doble cadena de ARN MS2. Independientemente del sustrato usado, los productos de hidrólisis eran nucleósidos y fósforo inorgánico (22).

A continuación se resumen las características de las enzimas de restricción descritas anteriormente (cuadro 1):

Cuadro 1. Resumen de algunas de las características de algunas enzimas de restricción

Microorganismo en la que fue descrita	Tipo de reacción	Sustrato	pH óptimo	Requerimiento iónico	Tipo de enlace	Resistencia al calor	Ref.
<i>B. subtilis</i>	exonucleolítica	nativo	6.6	Ca ⁺⁺			3
<i>B. subtilis</i>	exonucleolítica	nativo y desnaturalizado		Ca ⁺⁺	3' o 5' final		7
<i>Streptococcus</i> grupo A A, B, C, D		nativo	8.0 a 9.0 6.0	Ca ⁺⁺ y Mg ⁺⁺	3' final		9
<i>S. aureus</i>	exonucleolítica	desnaturalizado	8.6 a 9.0	Ca ⁺⁺	5' final	termoestable	5
<i>Ps. aeruginosa</i>		nativo		Ca ⁺⁺			14
<i>E. coli</i>	endonucleolítica	desnaturalizado	7.5 a 8.5	Mg ⁺⁺			16
<i>S. marcescens</i>			6.8	Mg ⁺⁺		termosensible	18
<i>M. sodonensis</i>	exonucleolítica	nativo y desnaturalizado	8.6 a 9.0	Ca ⁺⁺ , Mg ⁺⁺ , Mn ⁺⁺			22

METODOLOGIA PARA LA DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE DNasa BACTERIANA

Anteriormente se emplearon diferentes técnicas y métodos para la determinación de la capacidad de producción de DNAsas en diferentes géneros bacterianos, así con la ayuda de DNAsas de origen vegetal, se describen a continuación algunos de los más empleados en la bacteriología clínica para un diagnóstico diferencial. El propósito de conocerlos, como un apoyo ya que son considerados poco prácticos. El primero de éstos fué descrito por McFadyen en 1934 (3). Este investigador observó la producción de fósforo y nitrógeno al mezclar nucleínato de sodio al 4 % en una solución amortiguadora a pH de 6.6 con una suspensión bacteriana.

En 1948, McCarty (8) utilizando un método turbidimétrico determinó la capacidad bacteriana para producir DNasa. El medio de cultivo empleado fue un dializado de neopeptona, utilizando como sustrato una solución de desoxirribonucleato de sodio de timo de ternera al 0.1 % en amortiguador de veronal 0.025 M a pH 7.5 conteniendo $MgSO_4$ 0.01 M. Las determinaciones de la actividad las realizó extrayendo volúmenes de 1 ml a diferentes intervalos de tiempo en un lapso de 5 a 30 minutos. A la mezcla se le midió la densidad óptica a una longitud de onda de 425 nm.

McCarty (19) en 1949, empleó dos métodos diferentes para medir la actividad de nucleasa; el primero laborioso y de larga duración, se basa en medir la viscosidad del cultivo bacteriano que en contacto con desoxirribonucleato de sodio al 0.1 % y $MgSO_4$ 0.005 M, en amortiguador de veronal 0.025 M, pH 7.5. El segundo procedimiento se basa en la propiedad del desoxirribonucleato de sodio intacto de precipitar en presencia de alcohol, el cual forma una masa fibrosa flotante fácilmente observable a simple vista.

En 1950, Brown (10) utilizó el caldo infusión de carne pH 7.9, para la producción de la enzima, y empleó el método de McCarty para determinar la producción de DNasa (8).

Jeffries y cols. (1957) (15) en condiciones de cultivo diferentes a las descritas por McCarty en 1948 (8), preparó un medio el cual contenía glucosa, K_2HPO_4 , NaCl, $FeSO_4$, $MgSO_4$, y agar, al cual se agregaron 2 mg/ml de ácido nucleico, y la determinación de actividad enzimática se realizó en el medio de cultivo al añadir a la placa HCL 1 N. Se utilizó el principio del ácido nucleico no hidrolizado, que precipita dando la aparición de zonas claras alrededor de la colonia productora de DNasa.

Weckman y Catlin (23), por su parte determinaron la actividad de nucleasa de *Staphylococcus sp.*, además de la influencia de ciertos factores externos como la composición del medio de cultivo, el grado de aereación, el pH, la temperatura y el tiempo de incubación, óptimos para la producción de la enzima.

En 1960, Lehman (16) desarrolló otro método para conocer la capacidad de producción de DNasa de *E. coli.*, basado en el conteo de fragmentos solubles marcados con P³².

En 1962, Streitfeld (14), describió una modificación de la técnica empleada por Jeffries (15) para determinar la presencia de DNasa extracelular en *Pseudomonas*. Esta consistió en una solución de azul de toluidina al 0.1 % que es agente revelador de la actividad de la enzima. En caso de la presencia de DNasa el colorante forma un complejo de color rosa brillante, contrastando con el color azul del resto de la placa, las mayores zonas de hidrólisis de ADN se observaron en medios suplementados con calcio.

Messinova (6), utilizó un método espectrofotométrico para determinar la presencia de DNasa en cultivos de *Corynebacterium diphtheriae*; en éste después de 4 hr. de incubación a 37 °C, se agregaba H₂SO₄ al 0.25 N, precipitando el ADN no hidrolizado, para medir la densidad óptica del sobrenadante a 260 nm.

Eaves y Jeffries en 1963 (18), emplearon el método descrito por Anfinsen en 1954, para determinar la actividad de DNasa, en cultivos líquidos de *Serratia marcescens*. Este consistió en mezclar el sustrato en un amortiguador a pH 8.8 conteniendo $MgCl_2$ y el cultivo de *Serratia marcescens*, incubando a 37 °C por 30 minutos la reacción se detenía empleando una solución de acetato de uranilo al 0.75 % en ácido perclórico al 25 %, los sobrenadantes obtenidos después del tratamiento se leían espectrofotométricamente a 260 nm.

En 1965, Berry y Campbell (24), emplearon una variante de los métodos en agar, en la cual impregnaban con el sobrenadante de caldo de cultivo discos de papel filtro, estos se dejaban sobre la superficie del agar e incubaban a 37° C por 18 hr., la actividad se ponía de manifiesto con una mezcla de ácido tricloroacético al 10% en H_2SO_4 y ácido amino naftol sulfónico, las muestras positivas revelaban una zona clara azulosa alrededor del disco.

Cuatrecasas (11), utilizó ADN de esperma de salmón desnaturalizado por calor (100 °C por 30 minutos) para medir la actividad de DNasa de *Staphylococcus sp.*, basándose en el incremento de la absorbancia a 260 nm, en la hidrólisis de los ácidos nucleicos.

En 1969, Schreier (25) describió una modificación a la técnica de Jeffries (15) para diferenciar fácil y rápidamente *Serratia marcescens*, de los otros miembros

de la división *Klebsiella - Enterobacter - Serratia*; que consistió en añadir azul de o-toluidina en una concentración final de 0.01%.

Jarvis y Wynne (26), para determinar actividad de la enzima en cepas de *Staphylococcus*, se utilizó un medio de agar sangre con 0.2 % de desoxirribonucleato de sodio, en donde se observaron zonas de hidrólisis por adición de HCl 1.5 N.

Lachica y Deibel (27), describieron otros métodos de la actividad de desoxirribonucleasa bacteriana. Consiste de tres medios de cultivo diferentes, cubiertas de agar con naranja de acridina- desoxirribonucleato de sodio (1 % y 15 %, respectivamente), la placa incubada de 30 a 60 minutos y se observaba bajo luz ultravioleta, si se identificaban halos no fluorescentes alrededor de las cepas, productoras de DNAsas. Otro método, para la determinación de la estabilidad de la DNasa de *Staphylococcus sp.* a 100 °C por 15 minutos.

Nestle y Roberts (20), midieron la actividad de DNasa de *Serratia marcescens*, empleando los fragmentos de ADN solubles en ácido perclórico al 2 % y con una absorbancia a 260 nm.

Smith y cols. (28) propusieron una modificación del medio de agar DNasa descrito por Jeffries, la cual consistió en añadir una solución de verde de metilo cuya concentración final de 0.005 % (previamente tratado con cloroformo), se incubaba a 37 °C por 24 horas o más, se observaban zonas claras o rosadas alrededor de las colonias.

En 1971, Black y cols. (27), modificaron la técnica descrita por Smith (28) al cambiar la concentración final de la solución de verde de metilo a 0.02 %. Lachica y cols (30) describen varias técnicas para la determinación de la actividad de DNasa, semejantes a las descritas por Lachica y Deibel (27) para el naranja de acridina, utilizando azul de o- toluidina.

En 1972, Morton y Cohn (31), emplearon un medio de agar ADN- naranja de acridina cuya concentración final de éste último era de 0.4 %.

Erickson y Deibel (32) en 1973, describen un método rápido, sensible y bajo costo, que no requería de habilidad técnica especial para la estimación de la actividad de la DNasa; éste se basó en la relación entre turbidez y la cantidad presente de ácido nucleico precipitable.

Farmer III y cols. (33) recomendaron el uso de agar desoxirribonucleasa- azul de toluidina-cefalotina para el aislamiento primario de muestras clínicas sospechosas de *Serratia sp.*

Mc Faddin (5) en su manual resume las técnicas hasta entonces descritas para la determinación de actividad *in vitro* de DNasa, donde además de las ya mencionadas describe el procedimiento de Wolf y cols. (1978) que emplea un sustituto de sustrato, el 5- bromo- 4- cloro- 3- indolil- timidina- 3'- fosfato que tiene enlaces fosfato semejantes a los del ADN, que son susceptibles de la acción de la DNasa, en el sitio de enlace entre el anillo indolil y la timidina- 3'-fosfato, el cual desarrolla un color azul intenso al momento de ser hidrolizado. Al mismo tiempo señala la importancia de adicionar ADN al agar manitol- rojo de fenol , para el estudio de *Staphylococcus* patógenos, en el que se manifiesta la actividad de la enzima con el reactivo de Jeffries (15).

A continuación se resumen las metodologías semejantes y sus variaciones para un mejor entendimiento de lo planteado anteriormente.

Los primeros métodos empleados fueron los de precipitación y turbidimetría (cuadro 2).

Cuadro 2. Resumen de métodos que emplean precipitación-turbidimetría para la observación de la actividad de Dnasa

AÑO	Tipo de método	pH	Tipo de sustrato	Concentración de sustrato	Tiempo de incubación	Ref.
1934	pp AU-TCA	6.6	nativo	4 mg/ml	48h	3
1948	Turbidimétrico	7.5	nativo	0.1 mg/ml	5-30 min	8
1949	pp alcohol	NR	nativo	0.1 mg/ml	30 min	18
1950	Turbidimétrico	7.9	nativo	0.1 mg/ml	30 min	10
1957	Turbid. agar	<5.0	desnat.	2 mg/ml	36h	15
1957	pp acetona	NR	nativo	2 mg/ml	NR	22
1963	pp ácido agar	7.6-8.8	desnat.	2 mg/ml	48h	6
1965	pp TCA-ANS	8.6	nativo	0.001 mg/ml	18h	24
1965	pp TCA	8.6	nativo	0.001 mg/ml	18h	24
1969	Turbid. agar	NR	desnat.	2 mg/ml	18h	26
1973	Turbid. desnat.	8.8	desnat	1 mg/ml	>15 min	32
1980	manitol pp ác	7.3	desnat.	2 mg/ml	18h	5

pp= precipitación; AU-TCA=acetato de uranilo-ácido tricloroacético; TCA-ANS=ácido tricloroacético-ácido amino naftol sulfónico; NR= no reportado

Los siguientes métodos fueron basados en viscosimetría, espectrofotometría y colorimetría, (cuadro 3) así a continuación se presenta el resumen de las variaciones descritas anteriormente:

Cuadro 3. Resumen de métodos que emplean en viscosimetría-espectrofotometría-colorimetría para la determinación de la actividad de DNasa

AÑO	Tipo de método	pH	Tipo de sustrato	Concentración de sustrato	Tiempo de incubación	Ref.
1949	Viscosimétrico	7.5	nativo	2 mg/ml	36h	19
1957	Viscosimétrico	8.5	nativo	2 mg/ml	36h	23
1963	Espectrofotométrico	8.8	nativo	2 mg/ml	30 min	6
1963	Viscosimétrico	8.8	nativo desnat.	2.5 mg/ml	NR	6
1963	Espectrofotométrico	8.8	nativo	2 mg/ml	30 min	18
1967	Espectrofotométrico	9.0	desnat.	50 µg/ml	NR	11
1969	Espectrofotométrico	8.2	nativo	0.5 mg/ml	20 min	20, 21
1980	Colorimétrico	NR	X*	2 mg/ml	18-24h	5

X* = sustituto de sustrato: 5- bromo- 4- cloro- 3- indolil- timidina- 3'- fosfato; NR= no reportado

Otros métodos se basan en el uso de colorantes vitales para poner de manifiesto la presencia de ADN intacto (cuadro 4), y a continuación se resumen:

Cuadro 4. Variaciones de métodos para la determinación de actividad de DNasa que se basan en el uso de colorantes vitales

AÑO	Tipo de método	pH	Tipo de sustrato	Concentración de sustrato	Tiempo de incubación	Ref.
1962	CML-AOT noCa ⁺⁺	NR	NR	2 mg/ml	24-48h	14
1965	CML-AOT	8.6	nativo	0.001 mg/ml	18h	23
1969	CMA-AOT 0.01%	NR	desnat.	NR	18-24h	25
1969	CFA-NA 0.001%	9.0	desnat.	0.15 mg/ml	0-5h	27
1969	CMA-VM 0.005%	NR	desnat.	2 mg/ml	18h	28
1971	CMA-VM 0.02%	7.5	desnat.	2 mg/ml	18h	29
1971	CMA-AOT-DC	NR	desnat.	2 mg/ml	1-4h	30
1971	CMA-AOT-L	NR	desnat.	2 mg/ml	1-4h	30
1972	CFA-NA 0.004%	NR	desnat.	2 mg/ml	18h	31
1973	DNasa AOT-CA	NR	desnat.	2 mg/ml	24h	33
1985	CML-AOT 0.05%	NR	desnat.	NR	24-72h	34
1985	CMA-AOT 0.005%	NR	desnat.	NR	24-72h	34

CML= coloración metacromática en medio líquido; AOT= azul de o-toluidina; noCa⁺⁺= sin calcio; CMA= coloración metacromática en agar; CFA= coloración fluorescente en agar; NA= naranja de acridina; VM= verde de metilo; DC= doble capa de agar; L= laminilla; CA=cefalotina agar; NR= no reportado; las cantidades en % corresponden a la concentración del colorante

Y por último, los métodos que emplean un isótopo radioactivo (³²P) para marcar el sustrato sobre el que va a actuar la enzima (cuadro 5).

Cuadro 5. Métodos que emplean ³²P para la determinación de actividad de DNasas bacterianas

AÑO	Tipo de método	pH	Tipo de sustrato	Concentración de sustrato	Tiempo de incubación	Ref.
1960	pp ³² P	7.5	nativo	20 µM	30 min	18
1967	radioactivo ³² P	9.4	nativo desnat.	67 µM	30 min	7

³²P = fósforo radioactivo; mµmoles/ml. = milí micro moles por mililitro; µM= micro moles

ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN

Las enzimas de restricción de origen bacteriano que protegen a los microorganismos contra ADN extraños son llamadas endonucleasas de restricción, las cuales rompen ADN de doble-cadena en sitios específicos (dentro, adyacentes o a distancia de una secuencia conocida). La metilación del ADN bacteriano en el sitio de la secuencia de reconocimiento por la endonucleasa se traduce en la resistencia a la actividad de restricción enzimática. Las bacterias se protegen a sí mismas de sus endonucleasas de restricción por modificación de su propio ADN con metilasas endógenas, las enzimas de restricción en conjunto con sus metilasas protectoras son llamadas sistema de modificación-restricción (36).

La nomenclatura de las enzimas de restricción fue establecida por Smith y cols. (1973). Estas enzimas son nombradas, en primer lugar, empleando el origen de cada enzima el cual está dado por el microorganismo del cual se obtuvo, o por la National Culture Collection, para conocer información sobre el uso, así como el método empleado para la purificación de la enzima, usando las primeras tres letras del nombre del microorganismo (*Eco RI: Escherichia coli*). El segundo dato indica la secuencia específica que reconoce de ADN, los números romanos distinguen la secuencia que identifican enzimas del mismo origen (36). El tercero,

describe el procedimiento de purificación de la metilasa y; el cuarto, describe la secuencia que la metilasa reconoce, por ejemplo Taq I, *Thermus aquaticus* YTI (35).

Para clasificar a las endonucleasas se han considerado las secuencias específicas de ADN que rompen. Aunque en algunos casos no haya directamente evidencia genética para determinar la presencia de un sistema de restricción-modificación.

Se han descrito tres tipos de sistemas de modificación- restricción basados en la composición de la subunidad, los requerimientos de cofactor y el sitio de ruptura en el ADN (41) (Yuan, 1981). El sistema tipo I contiene tres diferentes subunidades y requiere de Mg^{++} , ATP y S- adenosil- metionina para romper el ADN. La ruptura ocurre en un sitio específico localizado hasta 7000 pares de bases de la unión o sitio de reconocimiento de la enzima. El sistema tipo II es el menos complejo y más adecuado para el análisis del ADN, estas endonucleasas consisten de una sola subunidad, y requieren solo de Mg^{++} para hidrolizar el ADN. Su característica favorable es que la ruptura del ADN la realiza en un sitio contiguo o dentro de la secuencia de unión de la enzima (figura 3) (41). El sistema tipo III consiste de dos diferentes subunidades, requiere también de Mg^{++} y ATP. La ruptura del ADN ocurre en un sitio no específico, pero solamente a 25 o 27 pares de bases menores del sitio de reconocimiento de la enzima.

Todas las endonucleasas de restricción disponibles comercialmente pertenecen al tipo II. Muchos de los sitios de reconocimiento tipo II son secuencias de 4 a 6 nucleótidos (muy pocas de 7 a 8 pares de bases de longitud) y poseen eje de simetría semejante, así que la ruptura idéntica de cada cadena: a) dos extremos idénticos con la misma secuencia en ambas direcciones (extensiones del 5'-fosfato o extensiones 3'-fosfato en cada cadena),



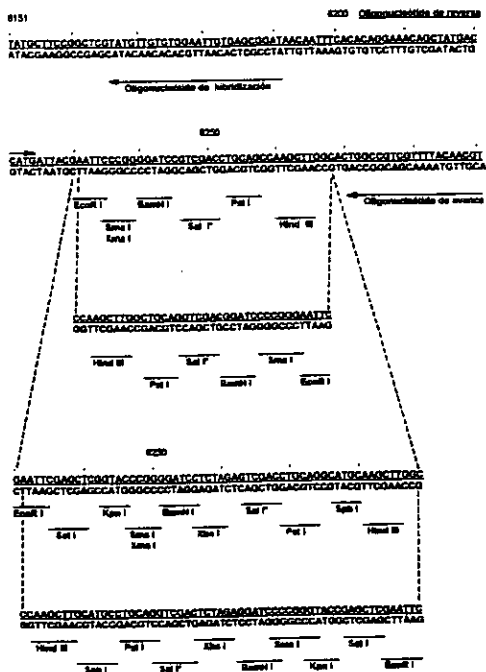
o b) dos extremos romos finales en cada cadena;



Ambas extensiones 3' y 5' son comúnmente llamadas cohesiones (adhesiones), o finales en contrasentido. Las enzimas de restricción con diferentes secuencias de reconocimiento que producen los mismos fragmentos finales de cadena forman familias de enzimas. Por ejemplo, Bam HI, Bcl I, Bgl II, Sau 3A y Xho II son miembros de la familia GATC. Es importante señalar que es la naturaleza de las formas terminales y no la secuencia de reconocimiento la que determina en sí misma la adecuabilidad de los fragmentos para subsecuentes estudios de mapeo cromosómico.

Todas las enzimas de restricción requieren de Mg^{++} como cofactor, y muchas funciones enzimáticas en un sistema amortiguador capaz de ajustar un intervalo de pH de 7.2 a 7.6. Las enzimas de restricción varían, no obstante, de su dependencia de la fuerza iónica (Wells, 1981 y Fuchs, 1983) (36), la cual es facilitada en tablas proporcionadas por el fabricante para lograr el 100% de actividad; así como la información sobre la actividad enzimática con diferentes amortiguadores de reacción para evaluar su utilidad en una reacción para dos enzimas diferentes (36, 40).

Figura 3. Secuenciación y selección de fragmentos de ADN del vector de clonación M13, utilizando diferentes enzimas de restricción



Fuente: Productos for Molecular Biology. Edited by Molecular SIGMA Biology, 1992 pp 6- 36. (39)

En general estas enzimas han sido obtenidas de una gran variedad de microorganismos, como son hongos y bacterias. A continuación se enlistan algunas de las que fueron descritas por Roberts en 1983 (Cuadro 6) (35):

CUADRO 6. Enzimas de restricción, secuencia específica de acción y microorganismo del cual fueron obtenidas

Microorganismo	Origen	Enzima	Secuencia	λ	SV40
<i>Acetobacter aceti</i>	IFO 3281	AaT (Stul)	AGGCCT	5	7
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	R.J. Roberts	AccI	GT (AC)(GT)AC	7	1
<i>Arthrobacter luteus</i>	ATCC 21806	AluI	AGCT	>50	35
<i>Anabaena variabilis</i>	ATCC 27892	AvaI	CPyCGPuG	8	0
<i>Anabaena variabilis</i>	ATCC 27892	Avall	GG(AT)CC	>17	6
<i>Bacillus amyloliquefaciens H</i>	F.E. Yong	BamHI	GGATC* C	5	1
<i>Bacillus aneurinolyticus</i>	IAM 1077	BanI (HgiCI)	GGPyPuCC	13	1
<i>Bacillus aneurinolyticus</i>	IAM 1077	BanII (HgjIII)	GPuGCPYC	7	2
<i>Bacillus caldolyticus</i>	A. Atkinson	BclI	TGATCA	7 ^d	1
<i>Bacillus globigii</i>	G.A. Wilson	BglI	GCCNNNNNGGC	22	1
<i>Bacillus globigii</i>	G.A. Wilson	BgIII	AGATCT	6	0
<i>Bacillus stearothermophilus P8</i>	N. Welker	BsaPI (Mbol)	GATC	>50	8
<i>Bacillus stearothermophilus ET</i>	N. Welker	BstEII	GGTNACC	11	0
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	D. Comb	BstNI (EcoRII)	CC (AT)GG	>35 ^d	16
<i>Caryophanon latum L</i>	H. Mayer	ClaI	ATCGAT	15	0
<i>Chromatium vinosum</i>	G.C. Grosveld	Cvnl (Saul)	CCTNAGG	>10	0
<i>Diplococcus pneumoniae</i>	S. Lacks	DpnI	GATC	only	methylated
<i>Enterobacter aerogenes</i>	P.R. Whitehead	EaeI (CfrI)	PyGGCCPu	>25	0
<i>Escherichia coli J62 pLG74</i>	L.I. Glatman	EcoRV	GATATC	14	1
<i>Escherichia coli RY13</i>	R.N. Yoshimori	EcoRI	GAA*TC	5	1
<i>Escherichia coli R245</i>	R.N. Yoshimori	EcoRII	CC*(AT)GG	>35 ^d	16
<i>Escherichia coli J62 pLG74</i>	L.I. Glatman	EcoRV	GATATC	14	1
<i>Haemophilus aegypticus</i>	ATCC 11118	HaeII	PuGGCGPy	>30	1
		HaeIII	GGC* C	>50	19
<i>Haemophilus gallinarum</i>	ATCC 14385	HgaI	GACGC	>50	0
<i>Haemophilus influenzae serotipo c, 1161</i>	J. Stuy	HincII	GTPyPuAC	34	7
<i>Haemophilus influenzae R₁</i>	S.H. Goodgal	HindII	GTPyPuA* C	34	7
		HindIII	AAGCTT	6	6
<i>Haemophilus influenzae R_F</i>	C.A. Hutchison	HinfI	GANTC	>50	10

*=nucleótido metilado; Py= pirimidina; Pu= purina; d=reacciones débilmente pero ésta reacción es observable; †=punto de corte de la enzima; ()=enzima con características similares, o indicación de isosquizómeros dentro de la secuencia. En las columnas λ y SV40 se indica la frecuencia de cortes por la enzima específica.

Fuente: Roberts, R.J. Nucleic acids Res. 11 (1):r135- r167. 1983. (35).

CUADRO 6. Enzimas de restricción, secuencia específica de acción y microorganismo del cual fueron obtenidas. (Continuación...).

Microorganismo	Origen	Enzima	Secuencia	λ	SV40
<i>Haemophilus influenzae</i> P ₁	S. Shen	HinPI	GCGC	>50	2
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	J. Setlow	Hpal	GTAA*C	13	4
		Hpall	CC*GG	>50	1
<i>Klebsiella pneumoniae</i> OKB	J. Davies	Kpnl	GGTACC	2	1
<i>Moraxella bovis</i>	ATCC 10900	MboI	GATC	>50 ^d	8
		MbolI	GAAGA	>50	16
<i>Moraxella nonlicuefaciens</i>	ATCC 17953	MnII	CCTC	>50	51
<i>Neisseria cinerea</i>	NRCC 31006	NciI	CC(CC)GG ^G	>15	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	G.A. Jacoby	Paer7I	CTCGAG	1	0
<i>Proteus vulgaris</i>	ATCC 13315	PvuI	CGATCG	3	0
		PvuII	CAGCTG	15	3
<i>Providencia stuartii</i> 164	J. Davies	PstI	CTGCA†G	18	2
<i>Rhodopseudomonas sphaeroides</i>	S. Kaplan	RsaI	GT†AC	>50	11
		RsrI (EcoRI)	GAATTC	5	1
<i>Serratia marcescens</i> S _p	C. Mulder	SmaI	CCC GGG	3	0
<i>Staphylococcus aureus</i> 3A	E. E. Stobberingh	Sau3AI (MboI)	GATC	>50 ^d	8
<i>Staphylococcus aureus</i> PS96	E. E. Stobberingh	Sau96I (AsuI)	GNCC	>30	11
<i>Streptococcus cremoris</i> F	C. Daly	ScrFI	CCNGG	>50	16
<i>Streptococcus faecalis</i> ND547	D. Clewell	SfaNI	GCATC	>50	6
<i>Salmonella infantis</i>	A. deWaard	SinI (Avall)	GG(AT)CC	>17	6
<i>Thermus aquaticus</i> YTI	J.I. Harris	TaqI	TCGA*	>50	1
		TaqII	?	>30	4
<i>Xantomonas badrii</i>	ATCC 11672	XbaI	TCTAGA	1 ^d	0
<i>Xantomonas holcicola</i>	ATCC 13461	XhoI	CTCGAG	1	0
<i>Xantomonas malvacearum</i>	ATCC 9924	XmaI (SmaI)	C†CCGGG	3	0
		XmaII (PstI)	CTGCAG	18	2
<i>Xantomonas oryzae</i>	M. Ehrlich	XorII (PvuI)	CGATCG	3	0

*=nucleótido metilado; Py= pirimidina; Pu= purina; d=reacciona débilmente pero esta reacción es observable; † = punto de corte de la enzima; () = enzima con características similares, o indicación de isosquizómeros dentro de la secuencia. En las columnas λ y SV40 se indica la frecuencia de cortes por la enzima específica.

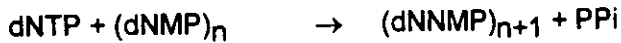
Fuente: Roberts, R.J. Nucleic acids Res. 11 (1):r135- r167. 1983. (35).

POLIMERASAS TERMOESTABLES

La replicación semiconservativa del ADN es el proceso que resulta de la formación de dos moléculas hijas idénticas en composición al ADN de origen, con cada una de sus cadenas. Las DNA polimerasas son enzimas que catalizan la síntesis de cadenas largas de polinucleótidos a partir de un ADN de cadena sencilla que sirve como templado, un cebador o "primer" y monómeros de nucleótido con un papel de molde durante este proceso. De acuerdo con la nomenclatura internacional de las enzimas, las DNA polimerasas son ligasas (sintetasas), definidas como una clase de enzimas que catalizan la formación de un enlace covalente, a la par con la hidólisis de un enlace de un nucleótido trifosfatado. Esta reacción se explica por un ataque nucleofílico del 3' hidroxil al fosfato alfa del nucleótido trifosfato. La polimerización siempre se lleva a cabo desde el 5'- fosfato al grupo 3'-OH terminal de la cadena de ADN que se sintetiza. A diferencia de las RNA polimerasas, las DNA polimerasas sintetizan cadenas de ADN, con una pequeña secuencia de inicio, el cebador (dNMP)_n, está unido a la cadena de ADN molde en un sitio que es complementario al mismo. Los desoxirribonucleótidos trifosfatados (dATP, DGTP, dCTP, dTTP) (dNTP) ataca al grupo 3'-OH de la desoxiribosa terminal libre del cebador, según la secuencia del molde de ADN. Los desoxirribonucleótidos trifosfatados son polimerizados (dNNMP)_{n+1}, los grupos α y los fosfato son liberados en forma de pirofosfatos

(PPi) (Figura 4) (36). A este proceso se le conoce con el nombre de Reacción de polimerasa en cadena (PCR).

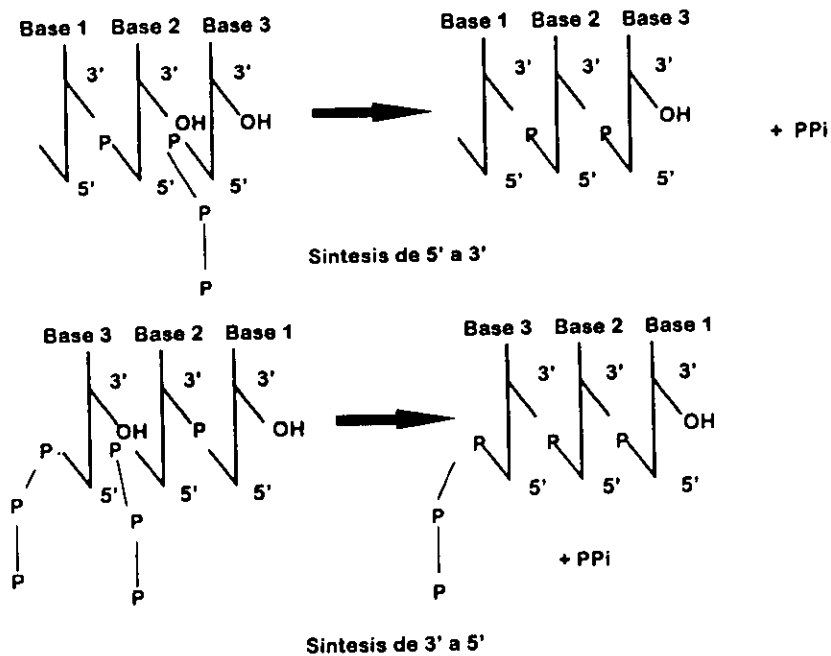
La siguiente reacción es catalizada por las DNA polimerasas:



Las DNA polimerasas descritas de *Escherichia coli* tienen tres diferentes estructuras moleculares y funciones (Pol I a Pol III). La DNA polimerasa I (enzima de Kornberg) tiene un peso molecular de 109 kD, pero es la más frecuentemente encontrada (400 moléculas/ célula), esta compuesta por aproximadamente 1,000 aminoácidos. presenta actividad de dos exonucleasas. La hidrólisis proteolítica parcial produce dos diferentes fragmentos: uno de 68 kD (fragmento Klenow) con actividad de polimerasa 5'-3' y de exonucleasa 3'-5', y un fragmento de 35 kD con actividad de exonucleasa 5'-3'. La DNA polimerasa II (120 kD, 50 moléculas/célula) cataliza la síntesis de ADN en ausencia de la Pol I y la Pol III, aunque no se ha dilucidado su función biológica con precisión. La DNA polimerasa III consiste en un mínimo de siete subunidades, la subunidad más larga es una polimerasa activa y tiene un peso molecular de 130 kD, este complejo cataliza la polimerización aproximadamente de 1,000 nucleótidos por segundo (36).

Las DNA polimerasas también son capaces de sintetizar cadenas de polinucleótido *in vitro* sobre un molde de ADN en presencia de dNTPs y cloruro de magnesio. En consecuencia, éstas enzimas pueden ser usadas en gran variedad de ensayos (secuenciación de ADN). Los experimentos son realizados a temperaturas, en las cuales las DNA polimerasas muestran tener su mayor actividad, con un intervalo de temperaturas entre 28 y 37 °C (36).

Figura 4. El ADN puede ser teóricamente elongado en ambas direcciones 3' a 5' y 5' a 3' con el uso de nucleósidos 5' trifosfato, solamente.



Fuente: Genetics and Molecular Biology, Ed. Johns Hopkins, 2th ed. pp 55, 1993.

La DNA polimerasa termoestable de *Thermus aquaticus* (Taq polimerasa) ha sido estudiada ampliamente; la enzima tiene un peso molecular de 63-68 kD fué caracterizada por Chien y cols. (1976) y por Kaledin y cols. (1980), muestra una actividad máxima cerca de 80 °C, a un pH de 8.0 y en presencia de los cuatro desoxirribonucleótidos trifosfatados, y su actividad esta fuertemente influenciada por la concentración de Mg^{++} (36).

Las DNA polimerasas de otras especies del género *Thermus* también han sido caracterizadas: *Thermus flavus* (1981), *Thermus ruber* (1981), *Thermus thermophilus* (1985, 1990) y *Bacillus stearothermophilus* (1981) (Bst) (36).

Las DNA polimerasas termoestables de Archaeobacterias fueron aisladas y caracterizadas de *Methanobacterium thermoautotrophicum* (1986), *Thermoplasma acidophilum* (1990), *Thermococcus litoralis* (1990), *Pyrococcus furiosus* (1986), *Sulfolobus acidocaldarius* (1989), y *Sulfolobus solfataricus* (1986). Las DNA polimerasas de *Methanobacterium thermoautotrophicum* y *Thermoplasma acidophilum* tienen actividad de exonucleasa 3'-5' a 65 °C y su peso molecular es de 72 y 88 kD, respectivamente. La DNA polimerasa de *Sulfolobus acidocaldarius* tiene actividad a 70 °C, permanece estable a una temperatura de 80 °C; una actividad de polimerización mayor a 200 nucleótidos/segundo a 100 °C, con un peso molecular de alrededor de 100 kD. Esta polimerasa ha sido usada en experimentos de la PCR con una sola cadena del

vector M13 y también con moldes de plásmidos y genes (1990). Los resultados a 70 °C son comparables a los que se obtienen con la Taq polimerasa, pero requiere menores concentraciones de magnesio (36).

IMPORTANCIA ACTUAL DE LAS DNAsas.

El empleo de las DNAsas ha resultado de la mayor trascendencia para el desarrollo de la biotecnología moderna, en la actualidad con estas se establece la identidad de organismos e individuos (bacterias, hongos y vertebrados) y de diferentes ADNs con técnicas de hibridación del ADN y análisis de restricción (37, 38, 39).

A la fecha se emplean alrededor de 50 diferentes DNAsas denominadas como enzimas de restricción, las cuales se utilizan para cortar y unir oligonucleótidos que permiten construir vectores de expresión génica. Estas enzimas requieren condiciones especiales, como son la concentración del sustrato, de los nucleótidos trifosfatados y de los cationes necesarios para la activación de la enzima; así como la temperatura y descomposición de la enzima, si ésta es termolábil; para actuar sobre los diferentes sustratos, los cuales pueden estar marcados con fluorocromos o isótopos radioactivos para ser detectado con lámpara de luz UV o autoradiografía respectivamente (40).

vector M13 y también con moldes de plásmidos y genes (1990). Los resultados a 70 °C son comparables a los que se obtienen con la Taq polimerasa, pero requiere menores concentraciones de magnesio (36).

IMPORTANCIA ACTUAL DE LAS DNAsas.

El empleo de las DNAsas ha resultado de la mayor trascendencia para el desarrollo de la biotecnología moderna, en la actualidad con estas se establece la identidad de organismos e individuos (bacterias, hongos y vertebrados) y de diferentes ADNs con técnicas de hibridación del ADN y análisis de restricción (37, 38, 39).

A la fecha se emplean alrededor de 50 diferentes DNAsas denominadas como enzimas de restricción, las cuales se utilizan para cortar y unir oligonucleótidos que permiten construir vectores de expresión génica. Estas enzimas requieren condiciones especiales, como son la concentración del sustrato, de los nucleótidos trifosfatados y de los cationes necesarios para la activación de la enzima; así como la temperatura y descomposición de la enzima, si ésta es termolábil; para actuar sobre los diferentes sustratos, los cuales pueden estar marcados con fluorocromos o isótopos radioactivos para ser detectado con lámpara de luz UV o autoradiografía respectivamente (40).

La reacción de polimerasa en cadena (PCR) nos permite la amplificación selectiva *in vitro* de regiones particulares del ADN por semejanza al fenómeno de replica *in vivo* del ADN. Los siguientes componentes son necesarios para llevar a cabo la reacción de la PCR: ADN de una sola cadena, que va a ser usado como molde; el cebador o iniciador o "primer" (secuencias de oligonucleótido complementarias a los nucleótidos del molde de ADN), los desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTP's) y una enzima DNA polimerasa. Una nueva cadena complementaria de ADN formada a partir del molde de ADN bajo condiciones apropiadas (figura 5). Los componentes para la reacción de PCR disponibles son: la cadena de ADN, que se obtiene por desnaturalización térmica de un ADN de doble cadena; los iniciadores (oligonucleótidos sintéticos) pueden ser sintetizados en el laboratorio o comprados; el amortiguador de reacción más comúnmente utilizado en PCR contiene Mg^{2+} , cationes monovalentes y algunos solventes (los co-solventes pueden ayudar a estabilizar la enzima, influye en la eficiencia de la enzima y/o la temperatura de fusión del ADN). La introducción de una DNA polimerasa termoestable, ha aportado desarrollos significativos para la automatización de la PCR, haciendo a los métodos de PCR más accesibles. Muchas de las DNA polimerasas usadas en PCR son termoestables y pueden soportar temperaturas de hasta 95-97 °C (36).

La PCR requiere por sí misma tres pasos térmicos:

1. Desnaturalización del ADN de doble cadena a 92- 96 °C;
2. Alineación de los oligonucleótidos iniciadores al sitio complementario del molde a 45- 72 °C y
3. Elongación del iniciador a través del extremo 3'-OH por sucesivas adiciones de dNTP's.

La extensión de la cadena ocurre a 72 °C. El esquema de desnaturalización, alineamiento y extensión en cada paso esta definido por un período fijo de tiempo que es llamado ciclo. La repetición de tal ciclo nos da como producto final la amplificación del ADN (36).

El método de PCR fue descubierto y nombrado por Mullis y cols. en la corporación CETUS, aunque el principio fue descrito en detalle por Khorana y cols. una década después. El uso de la PCR esta limitado para polimerasa de ADN termosensible que puede ser ampliamente disponible. Los oligonucleótidos son acomodados de tal forma que la reacción de extensión, directamente sintetiza hacia el ADN de la siguiente cadena (figura 6). Así el oligonucleótido "A" que sirve de molde para la síntesis de una cadena de ADN complementaria, la cual puede entonces ser el oligonucleótido para sintetizar "B" y viceversa. Así resulta en la

síntesis *de novo* de la región de ADN flanqueada por los dos oligonucleótidos. La PCR amplía el desarrollo del análisis del ADN y ARN porque para ambos simplifica la tecnología existente y enseña el desarrollo de nuevas técnicas que en otro tiempo no hubiesen sido posibles (41, 42).

En biología molecular, las endonucleasas de restricción son empleadas como un medio de caracterización de fragmentos de ADN (mapeo de ADN) y de modificación del ADN para ingeniería genética (clonación). La aplicación más común de éstas enzimas junto con la reacción de polimerasa en cadena (PCR) es la validación de la especificidad del producto generado por la amplificación, la cual puede ser determinada por análisis de fragmentos de restricción, generados después de la digestión con una endonucleasa que rompe el ADN en fragmentos de longitud definida. El conocimiento de las endonucleasas de restricción y sus requerimientos ha sido muy útil cuando el propósito del experimento es clonar el producto de PCR. En este caso los sitios de unión usados para PCR, contienen usualmente un sitio de reconocimiento sintéticamente introducido en la región 3' de cada una de las cadenas. El producto procesado para PCR modificado en su secuencia 3' puede ser subsecuentemente hidrolizado con una endonucleasa de restricción apropiada y clonado dentro de un vector, el cual ha sido previamente digerido con una endonucleasa de restricción idéntica para producir extremos finales compatibles para la clonación (36).

La adecuada selección de la digestión por enzimas de restricción consiste en elegir la enzima apropiada y proveer las condiciones óptimas para una actividad enzimática completa (36).

La selección de una enzima para la validación de la especificidad del producto de PCR, esta dado por el mismo producto. Para propósitos prácticos es recomendable elegir una enzima de restricción, la cual pueda generar fragmentos de restricción de diferentes longitudes y que todos los fragmentos puedan ser separados en un mismo gel de agarosa. En suma, es necesario que hasta los fragmentos más pequeños puedan ser detectados, para que no haya ninguna duda en garantizar la exactitud del ensayo. Ya que la cantidad mínima de ADN detectable por transiluminación UV es aproximadamente de 10 ng, esto implica que una gran cantidad de productos de PCR que al ser cortados producen bandas muy pequeñas que podrían estar en el límite de detección (36).

Si la secuencia del sitio de restricción puede ser introducida dentro del 5' final de (los) oligonucleótido(s) para clonación, hay que tener cuidado de que del sitio de reconocimiento sea de una enzima conocida que corte eficientemente, a pesar de la localización del sitio de ruptura. Kaufmann (1990) y Crouse (1986) (36) investigaron la eficiencia del rompimiento de un número de enzimas de restricción comúnmente usadas cuando la secuencia de reconocimiento esta localizada en el extremo final del fragmento del ADN. Ellos encontraron que varias enzimas comunes, incluyendo Sal II, Hind III y Xpa I, faltan por romper los

extremos finales de fragmentos de ADN, mientras que otras tales como Sal I, Eco RI, Xho I, Acc I y Dra II generalmente rompen eficientemente. La elección de una enzima de restricción para un experimento requiere del reconocimiento de una secuencia la cual no sea fácilmente rota en localización terminal entonces una segunda opción es posible. Como la secuencia 5' de un oligonucleótido no juega un papel esencial para la reacción de extensión durante el PCR. Se diseñó el oligonucleótido de manera tal que presente nucleótidos adicionales en el 3' de la secuencia de reconocimiento, puede incrementar la eficiencia del rompimiento. Es importante hacer notar que la secuencia de nucleótidos alrededor de la secuencia de reconocimiento puede afectar la eficiencia del rompimiento (36).

El tamaño de un fragmento desconocido de ADN por amplificación influye en el producto del PCR lo que nuevamente afecta cualquier intento de secuenciación subsecuente de la región desconocida. Aunque es difícil predecir la frecuencia del sitio de corte de una endonucleasa de restricción, existen algunas guías. Brooks (1987) (36) reportó dentro de una secuencia de ADN al azar, con un contenido del 50% GC, que en una secuencia de reconocimiento de 4 bases puede ocurrir estadísticamente cada 256 bases y con una secuencia de 6 bases a intervalos de 4 Kb y con una secuencia de 8 bases a intervalos de 65 Kb. Si es necesario se debe emplear una segunda enzima para linearizar el ADN después de la unión cuando la enzima raramente rompe el ADN genómico, pero en estos casos no rompe dentro del ADN de la región amplificada (36).

El análisis de los fragmentos de restricción por PCR revela algo más que la especificidad, éste también se usa para diferenciar entre organismos cercanamente relacionados, alelos o subtipos dados, que la región del ADN a ser examinada sea polimorfica, tal que la secuencia interna sólo se defina por un sitio de restricción en la amplificación por PCR, la cual da distinto y único patrón de bandas en un corrimiento. Rodu y cols. (1991) han empleado este recurso para diferenciar entre el virus del papiloma humano de los tipos 6, 11, 16 y 18, los cuales están asociados con lesiones preneoplásicas o cancerosas de los tractos digestivo y genital. Este recurso también ha sido empleado en el diagnóstico y detección de mutaciones alélicas asociadas con la anemia de células falciformes y la hemofilia tipo A (36).

Las DNA polimerasas son portadoras de la síntesis de cadenas complementarias de ADN en dirección 5' a 3' usando una plantilla de una sola cadena, pero iniciando de la región de una doble cadena abierta. Esta es la primera reacción de extensión que es la base para una variedad de técnicas de marcación y secuenciación (41, 42).

Si dos diferentes iniciadores- cada uno unido selectivamente a una de las cadenas complementarias- son elongados pasando cada uno por su ciclo de amplificación, entonces cada nueva cadena de ADN creada contiene el sitio de

unión del otro iniciador. De este modo, cada nueva cadena sirve de molde para un futuro ciclo de amplificación, así, se amplia el número de moléculas molde de ciclo en ciclo. La repetición de los ciclos de amplificación teóricamente llevan a cabo una síntesis exponencial de un fragmento de ADN con una longitud definida por el extremo 5' terminal del par de iniciadores empleados. La síntesis exponencial del fragmento de ADN se expresa matemáticamente con la siguiente fórmula:

$(2^n - 2n) \times$ donde : n = número de ciclos de temperatura,

$2n$ = productos de elongación primaria y secundaria de
indeterminada longitud,

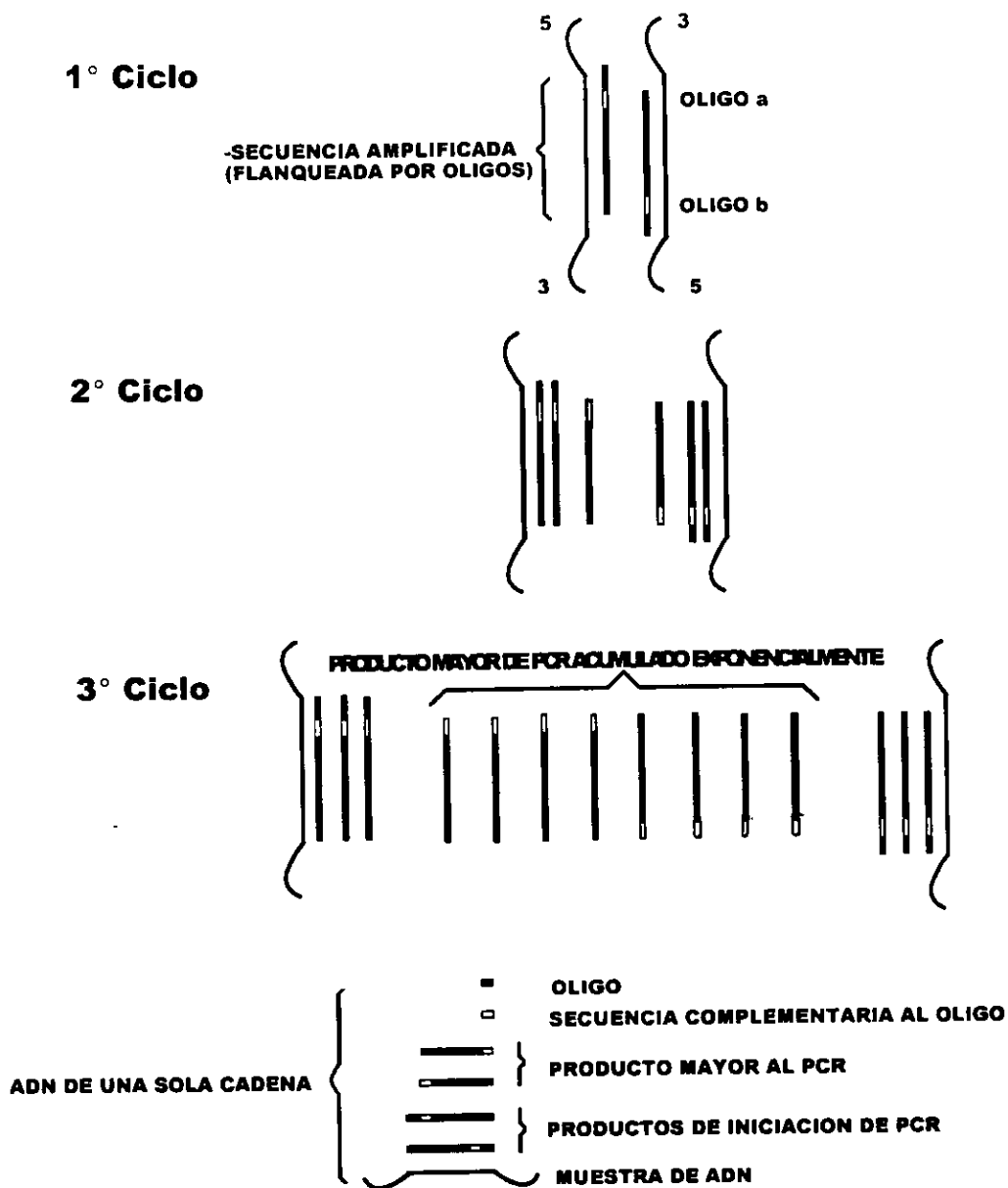
x = número de copias del molde original.

Los desoxirribonucleótidos y el oligonucleótido deben estar presentes en exceso para que la síntesis se repita después del calentamiento del nuevo ADN sintetizado, separando las cadenas y para ser completadas sus secuencias (42).

En principio, cada componente físico y químico de un ensayo de PCR es considerado como un factor para modificar e incrementar potencialmente en calidad, siendo factores dependiente uno de otro. (36) Estos factores incluyen:

1. Equipamiento, por ejemplo el tipo de tubo de reacción, el tipo de termociclador.
2. La temperatura, tiempo y número de ciclos térmicos.
3. La concentración de DNA polimerasa; el tipo de enzima y el amortiguador de reacción con los co- solventes.
4. Las concentraciones de los desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTP's)
5. Los cebadores o iniciadores.
6. Volumen óptimo del aceite mineral.
7. Muestra problema de ADN (cantidad y pureza)
8. Tamaño y estructura del producto de amplificación.
9. La estrategia seleccionada.

Figura 6. Diagrama esquemático de la reacción de polimerasa en cadena



Fuente: PCR. A Practical Approach. Edited M.J. McPherson, P. Quirke y G.R. Taylor. IRL Press. pp. 8. 1991. (42)

La combinación del análisis de fragmentos de restricción y la PCR como estrategia de tipificación, ofrece un sistema de detección simple, rápido y altamente sensible. Por otro lado, las mutaciones naturales que producen un cambio en el sitio de restricción son muy raros, así se limita la aplicabilidad de este recurso. Los cambios pueden de esta forma ser seleccionados experimentalmente para introducirse en uno de los sitios de restricción de un producto de amplificación (amplicon) de la PCR. La PCR es utilizada para mutagénesis, como un recurso para introducir cambios en el amplicon (36). Esto basado en la observación de que el extremo 3' del iniciador no alinie y por lo tanto la unión no se lleva a cabo; así el sitio de restricción de la enzima puede ser introducido solamente dentro de un alelo específico, para su posterior uso en la PCR.

DISCUSION

La mayoría de los microbiólogos tienen como una de sus metas primordiales establecer procedimientos de laboratorio rápidos y accesibles para la identificación de microorganismos. En la búsqueda de ellos han surgido grandes descubrimientos, los cuales desafortunadamente para los pioneros solo

La combinación del análisis de fragmentos de restricción y la PCR como estrategia de tipificación, ofrece un sistema de detección simple, rápido y altamente sensible. Por otro lado, las mutaciones naturales que producen un cambio en el sitio de restricción son muy raros, así se limita la aplicabilidad de este recurso. Los cambios pueden de esta forma ser seleccionados experimentalmente para introducirse en uno de los sitios de restricción de un producto de amplificación (amplicon) de la PCR. La PCR es utilizada para mutagénesis, como un recurso para introducir cambios en el amplicon (36). Esto basado en la observación de que el extremo 3' del iniciador no alinie y por lo tanto la unión no se lleva a cabo; así el sitio de restricción de la enzima puede ser introducido solamente dentro de un alelo específico, para su posterior uso en la PCR.

DISCUSION

La mayoría de los microbiólogos tienen como una de sus metas primordiales establecer procedimientos de laboratorio rápidos y accesibles para la identificación de microorganismos. En la búsqueda de ellos han surgido grandes descubrimientos, los cuales desafortunadamente para los pioneros solo

redundaron en observaciones y proyectos que muchas veces no resultaron tan satisfactorios como se especulaba.

Para la caracterización de microorganismos, los procedimientos que se utilizaban inicialmente se enfocaban a determinar el fenotipo de los mismos, en la actualidad se busca identificar o establecer las características genotípicas, con lo cual se establece perfectamente la identidad clonal de un microorganismo.

Las DNAsas identificadas inicialmente por Tillet en 1900, se emplearon como un sistema para la caracterización de bacterias; su subsecuente aislamiento y caracterización se constituyeron la base tecnológica para el desarrollo de una nueva ciencia conocida actualmente como biología molecular.

La identificación de DNAsas dió lugar al desarrollo de un gran número de procedimientos de laboratorio (turbidimetría, precipitación, viscosimetría, espectrofotometría, tinción metacromática, tinción fluorescente) para la obtención y caracterización de estos productos. Los resultados obtenidos al respecto han permitido conocer que diversos microorganismos eran capaces de elaborar DNAsas. (2) Esta propiedad, al ser compartida por tantas especies bacterianas, resultaba poco útil para el propósito planteado originalmente, es decir la caracterización de especies bacterianas.

Es importante mencionar que las observaciones, resultado de muchos años de trabajo y esfuerzo de un gran número de investigadores, establecieron que los microorganismos elaboraban DNAsas, con un efecto específico sobre el ADN, proveniente de especies diferentes (2); este conocimiento permitió entender como es que una bacteria protege su nicho ecológico y como incluso existe un fenómeno de regulación en relación al número de bacterias existentes en un determinado habitat.

Al investigarse más a fondo sobre las DNAsas se sabe que las características de sus productos, así como, su actividad específica, finalmente permitió entender su participación en la regulación bacteriana (39). Con el paso del tiempo la observación de que estas enzimas actuaban rompiendo sitios específicos en el ADN, dio lugar a que se iniciara una nueva ciencia la ingeniería genética (39). Al mismo tiempo se empezaron a utilizar para el estudio de material genético extracromosómico, el cual a través del empleo de la transformación bacteriana permitió conocer las propiedades particulares de algunos de los genes que lo constituían.

El avance en el conocimiento científico por el uso de estos productos bacterianos (las DNAsas) fue enorme y de gran ayuda para el desarrollo de la medicina y de otras ciencias afines (8,18).

El conocimiento más profundo de las DNAsas permitió establecer como ya se ha mencionado que cada una rompe secuencias específicas del ADN, hecho que dió lugar a que se buscará un sistema para clasificarlas asignándoles el término de endonucleasas de restricción. Tal hecho dió lugar a que las enzimas se agruparan en familias, asignándoles un nombre específico a cada una de las enzimas, dependiendo del microorganismo del que fueron aisladas y un número para establecer el tipo de endonucleasa identificada en cada especie bacteriana.

La biotecnología se ha desarrollado grandemente por el avance que ha tenido a su vez la ingeniería genética. Esta última ha sido la ciencia responsable de utilizar óptimamente las DNAsas para la clonación y secuenciación de genes (36). Con esta metodología se ha avanzado en el conocimiento de genes específicos responsables de la expresión de proteínas como insulina y el interferon, productos que con el desarrollo de la biotecnología para producirse industrialmente con la ventaja de que al expresarse por genes humanos, la especificidad del producto es mayor y la posibilidad de reacciones adversas, menor (40).

Actualmente, se esta trabajando intensamente en la secuenciación del genoma humano, como un evento primordial para la prevención de enfermedades en el hombre (37). Al respecto, se han tenido algunos avances y en la actualidad se establece el diagnóstico prematuro de padecimientos como la fibrosis quística, la diabetes mellitus, etc.; incluso antes del nacimiento (35).

La identificación de genes específicos causales o relacionados con la susceptibilidad de producir ciertas enfermedades se utilizaban no solamente para el diagnóstico oportuno, sino también para la prevención, diagnóstico pre sintomático, esta sería de las aplicaciones de la biología molecular, relacionada con el uso de las DNAsas o enzimas de restricción.

El estudio de mecanismos de patogenicidad de los microorganismos ha tenido un enorme avance en los últimos años (39). El empleo de las enzimas de restricción permite conocer las secuencias específicas relacionadas con la expresión de propiedades de virulencia, y actualmente apoya al desarrollo de vacunas, con procedimientos de recombinación genética (35, 36) por ejemplo el cólera. También el empleo de secuencias específicas relacionadas con virulencia, pueden ser marcadas con material radioactivo u otros productos (sondas moleculares), que permiten la identificación más rápida de un gran número de microorganismos con ciertas propiedades de virulencia, y la realización de estudios epidemiológicos.

La epidemiología molecular es un área de la ciencia que ha empezado a desarrollarse gracias al descubrimiento de las DNAsas, consiste en utilizar las sondas moleculares para la identificación de individuos (hombres, animales, bacterias, etc.) portadores de información genética específica, permitiendo de esta manera identificar más fácilmente a personas afectadas de enfermedades

como la diabetes, fibrosis quística, fenilcetonuria, etc., así como los microorganismos causantes de enfermedades tan extenuantes a nivel mundial por ejemplo el cólera.

El desarrollo de la biomedicina ha sido la aplicación más importante que las enzimas de restricción de origen bacteriano han tenido desde que fueron identificadas por primera vez.

Desde los valiosos trabajos de Mendel hasta el descubrimiento del ADN, la comprensión de la naturaleza de los genes ha transcurrido por un sentido complejo que durante las últimas décadas, se ha ampliado grandemente. Al considerarse en el pasado que la actividad de la desoxiribonucleasa tendría un valor para determinar la virulencia de especies de bacterias que tienen la capacidad de destruir el ADN de microorganismos ajenos a su especie. Se desarrollaron técnicas para valorar fácilmente su actividad, así se describieron métodos laboriosos y costosos como los descritos por McCarty (19) y Lehman (16) y otros más sencillos y simples como los descritos por Jeffries (15) y Lachica (27), las cuales cayeron en desuso, quizás debido a que no se les encuentra una utilidad real, ya que se conocen otras pruebas para reconocer la virulencia de un microorganismo.

Cuando se describe la existencia de material genético extracelular, los plásmidos, se emplea la existencia de estas enzimas para explicar el comportamiento de

éstos, dentro del núcleo de la célula, así se procedió a caracterizar cada una de las secuencias de ADN y sus características físicas. Así para 1974 se describen técnicas de ADN recombinante, que consisten en cortar el material genético en determinada secuencia conocida del gen de interés con una DNasa de restricción e introducir el ADN de interés en el sitio de corte mediante el uso de una ligasa (enzima que unira el nuevo ADN en el punto de corte).

Así se han desarrollado métodos para introducir información genética (trasnformación) para que un microorganismo sintetize una u otra proteína, empleando vectores (moléculas capaces de atravesar la membrana de la célula blanco y depositar en su interior el gen elegido). La biotecnología ha logrado avances notables en la producción de proteínas como la insulina, el factor de coagulación VIII, etc. Las células blanco, por ejemplo las bacterias, levaduras, e inclusive en células animales, en las que únicamente hay que cuidar su buena reproducción, para lograr la producción de la proteína de interés. Esto ha permitido ampliar la lista de productos que se pueden obtener en forma masiva por este medio, algunos ejemplos de ellos son antibióticos, hormonas como la insulina, citocinas como el interferon y mesf (el factor estimulador de formación de colonias de monocitos), alcaloides, vitaminas, colorantes, etc.

Estas técnicas de ADN recombinante también han servido para el diagnóstico rápido y preciso de enfermedades, a partir de una gota de sangre; para la identificación rápida de bacterias empleando sondas moleculares (fragmentos de

ADN específicos para cada bacteria). Así como, el desarrollo de células productoras de anticuerpos monoclonales, para su producción hibridomas que son el resultado de la hibridización de un linfocito B (célula productora de anticuerpos) de ratón inmunizado con el antígeno y células procedentes de mieloma, ya que estos últimos son capaces de reproducirse indefinidamente, dentro de un cultivo.

También se han usado para la identificación de individuos, como es el caso de disputa paterna, medicina forense y análisis de ligamento genético, entre otras.

CONCLUSIONES

Desde la descripción del ADN como el material que guarda la información que codifica para toda función celular, hasta nuestros días; vemos que el conocimiento de la maquinaria celular que lleva a cabo estos procesos de conoce cada día mejor. Se desarrollaron técnicas para la determinación de la actividad de las enzimas que permitían romper la estructura de esta molécula compleja, así como conocer los mecanismos de protección de la célula para no afectar su propio ADN y si los de otras células, como sucede con algunas bacterias.

Cuando los investigadores se dieron a la tarea de reproducir el fenómeno de replicación de ADN, se dieron cuenta que para tal efecto, podían hechar mano de las enzimas extracelulares producidas por algunas bacterias, entre las que eligieron para sus primeros ensayos fueron con DNA polimerasas termosensibles, llamado fragmento de "Kienow", el cual hacía laboriosa la tarea de polimerización que se debía agregar continuamente; ya que ésta se inactivaba al desnaturalizar el ADN de doble cadena recientemente formado.

Asi se dieron a la tarea de aislar otras DNAsas y DNapolimerasas para hacer más eficiente este proceso; encontrando que las enzimas aisladas de *Thermus aquaticus* eran las ideales para este proceso.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

En cuanto al estudio de las DNAsas, que cayeron en desuso por no encontrar una utilidad real para usarlas como marcadores de virulencia de microorganismos, se dedicaron a aislarlas y caracterizarlas para emplearlas para cortar y secuenciar el ADN, ya que cada una de estas requiere de una secuencia específica para poder actuar sobre el ADN, así se emplean actualmente alrededor de 50 enzimas diferentes; las cuales se han aislado de diferentes microorganismos.

Esto ha permitido el desarrollo de múltiples técnicas para poder conocer las anormalidades a nivel de ADN que dan origen a enfermedades como la diabetes mellitus, la susceptibilidad a cáncer, la ausencia de enzimas necesarias para degradar ciertos metabolitos como fenilalanina, tirosina, ácidos grasos, los cuales al no ser degradados se acumulan provocando trastornos severos y llevar a la muerte.

El desarrollo de la reacción de polimerasa en cadena o PCR ha incrementado la utilidad de estas enzimas debido a que ahora se pueden trabajar con cantidades mayores de material genético sobre el cual se pueden hacer múltiples estudios de secuenciación, detectando mutaciones simples o múltiples que se pueden presentar en diferentes individuos de una misma familia, así como conocer si estas están ligadas a cromosomas sexuales o autosómicos.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Watson, et al. Molecular Biology of the Gene. Ed. Benjamin Cummings. pp 280-300. 1987.
- 2.- Stanley, J.T. y N.R. Krieg. Bacterial Clasification I to V. En Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Ed. Williams and Wilkins. 9th. Edition. pp 1-36. 1986.
- 3.- McFadyen, D.A. The nuclease activity of *Bacillus subtilis*. Biol. Chem. 107:297-308. 1934.
- 4.- Murray, R.K., D.K. Granner, P.A. Mayer y V.W. Rodwell. Estructura y función de los ácidos nucleicos. En Bioquímica de Harper. Ed. Manual Moderno. 11a. Edición. pp. 375-412. 1988.
- 5.- Mac Faddin, J. Deoxyribonuclease (DNase) and thermonuclease test. En Biochemical Test for Identification of Medical Bacteria. Ed. Williams & Wilkins. pp. 94-113. 1980.
- 6.- Messinova, O.V., D.V. Yusupova y N.S. Shamsutdinov. Deoxyribonuclease activity of *Corynebacterium* and its relation to virulence. Fed. Proc. 22:T1033-1035. 1963.
- 7.- Kerr, I.M., J.R. Chien y I.R. Lehman. Exonucleolytic degradation of high molecular weight desoxyribonucleotic acid and ribonucleotic acid to nucleoside 3' phosphates by a nuclease from *Bacillus subtilis*. J. Biol. Chem. 242:2700-2708. 1967.
- 8.- McCarty, M. The occurrence of nucleases in cultures filtrates of group A hemolytic Streptococci. J. Exp. Med. 88:181-188. 1948.

- 9.- Wannamaker, L.W. y J.M. Masten Streptococci and Streptococcal diseases. Ed. Academic Press, pp. 143- . 1972.
- 10.- Brown, A.L. A survey of nuclease production by streptococci. J. Bacteriol. 60:673-675. 1950.
- 11.- Cuatrecasas, P., S. Fuchs y C.B. Anfinsen. Catalytic properties and specificity of the extracellular nuclease of *Staphylococcus aureus*. J. Biol. Chem. 242:1541-1547. 1967.
- 12.- Lachica R.V.F., P.D. Hoeprich y C. Genigeorgis. Nuclease production and lysostaphin susceptibility of *Staphylococcus aureus* and other catalase-positive cocci. Appl. Microbiol. 24(6):920-923. 1972.
- 13.- Fusillo, M.H. y D.L. Weiss. Quantitative estimation of staphylococcal deoxyribonuclease. J. Bacteriol. 78:520-522. 1959.
- 14.- Streitfeld, M.M., E.M. Hoffmann y H.M. Janklow. Evaluation of extracellular deoxyribonuclease activity in *Pseudomonas*. J. Bacteriol. 88:77-80. 1962.
- 15.- Jeffries, Ch.D., D.F. Hoffmann y D.G. Guse. Rapid method for determining the activity of microorganisms on nucleic acids. J. Bacteriol. 73:590-591. 1957.
- 16.- Lehman, I.R. The deoxyribonucleases of *Escherichia coli*. I. Purification and properties of a phosphodiesterase. J. Biol. Chem. 235 (5):1479-1487. 1960.
- 17.- Lehman, I.R., G.G. Roussos y E.A. Pratt. The deoxyribonucleases of *Escherichia coli*. II. Purification and properties of a ribonucleic acid-inhibitable endonuclease. J. Biol. Chem. 237(3):819-828. 1962.

- 18.- Eaves, G.N. y Ch.D. Jeffries. Isolation and properties of an exocellular nuclease of *Serratia marcescens*. J. Bacteriol. 85:273-278. 1963.
- 19.- McCarty, M. The inhibition of streptococcal deoxyribonuclease by rabbit and human antisera. J. Exp. Med. 90:543-553. 1949.
- 20.- Nestle, M. y W.K. Roberts. An extracellular nuclease from *Serratia marcescens*. I. Purification and some properties of the enzyme. J. Biol. Chem. 244:5213-5218. 1969.
- 21.- Nestle, M. y W.K. Roberts. An extracellular nuclease from *Serratia marcescens*. II. Specificity of enzyme. J. Biol. Chem. 244:5219-5225. 1969.
- 22.- Berry, S.A. y J.N. Campbell. The extracellular nuclease activity of *Micrococcus sodonensis*. Biochim. Biophys. Acta 132:84- . 1967.
- 23.- Weckman, B.G. y B.W. Catlin. Deoxyribonuclease activity of micrococci from clinical sources. J. Bacteriol. 73:747-753. 1957.
- 24.- Berry, S.A. y J.N. Campbell. A diffusion plate technique for the detection of polynucleotide depolymerase and phosphatase activity. Biochim. Biophys. Acta 99:566-569. 1965.
- 25.- Scherier, J.B. Modification of deoxyribonuclease test medium for rapid identification of *Serratia marcescens*. Am. J. Clin. Pathol. 51(6): 711-716. 1969.
- 26.- Jarvis, J.D. y C.D. Wynne. A short survey of the reliability of the deoxyribonuclease as an adjunct in the determination of the staphylococcal pathogenicity. J. Med. Lab. Technol. 26:131-133. 1969.

- 27.- Lachica R.V.F. y R.H. Deibel. Detection of nuclease activity in semisolid and broth cultures. *Appl. Microbiol.* 18(2):174-176. 1969.
- 28.- Smith, P.B., G.A. Hodgson y A. McKechnie. Improved medium for detecting deoxyribonuclease producing bacteria. *Appl. Microbiol.* 18:991-993. 1969.
- 29.- Black, W.A., R. Hodgson y A. McKechnie. Evaluation of three methods using deoxyribonuclease production as a screening test for *Serratia marcescens*. *J. Clin. Pathol.* 24:313-316. 1971.
- 30.- Lachica R.V.F., C. Genigeorgis y P.D. Hoepflich. Metachromatic agar diffusion methods for detecting staphylococcal nuclease activity. *Appl. Microbiol.* 21(4):585-587. 1971.
- 31.- Morton, H.E. y J. Cohn. Coagulase and deoxyribonuclease activities of staphylococcal isolated from clinical sources. *Appl. Microbiol.* 23(4):725-733. 1972.
- 32.- Erickson, A. y R.H. Deibel. Turbidimetric assay of staphylococcal nuclease. *Appl. Microbiol.* 25(3):337-341. 1973.
- 33.- Farmer III, J.J., F. Silva y D.R. Williams. Isolation of *Serratia marcescens* on deoxyribonuclease-toluidine blue-cephalothin agar. *Appl. Microbiol.* 25(1):151-152. 1973.
- 34.- Waller, J.R., S.R. Hodel y R.N. Nuti. Improvement of two toluidine blue o-mediated techniques for DNase detection. *J. Clin. Microbiol.* 21(2):195-199. 1985.
- 35.- Roberts, R.J. Restriction and modification enzymes and their recognition sequences. *Nuc. Acids Res.* 11: r135- r167. 1983.

- 36.- Rolf, A. y cols. Restriction fragment Analysis of PCR Clinical Diagnostics and Research. Springer Laboratory. pp. 136- 148. 1992.
- 37.- Murphy, G. y E. Ward. Sequencing of Double-Stranded DNA of Nucleic Acids Sequencing. A practical approach. Edited by C.J. Howe and E.S. Ward. IRL Press, pp. 99-115, 1989.
- 38.- Lichtenstien, C. y J. Draper. Genetic Engineering of Plants of DNA Clining. Volume II. A practical approach. Edited by D.M. Glover. IRL Press, pp. 67-119. 1989.
- 39.- Watson, Hopkins, Roberts y Steitz-Weiner. The Estructures of DNA of Molecular Biology of the gene. Edited by B. Cummings. 4th Edition. pp. 240-281. 1987.
- 40.- Products for Molecular Biology. Edited by Molecular SIGMA Biology, pp. 6-36. 1992.
- 41.- Darmell, Lodish. Manipulating Macromolecules of Molecular cell biology. 2th Edition. Scientific American Book. pp. 194-220. 1990.
- 42.- PCR. A Practical Approach. Edited M.J. McPherson, P. Quirke and G.R. Taylor. IRL Press. Chapter 1. pp 1- 10. 1991.
- 43.- Deshydrated culture media and reagents for microbiology. Manual de productos DIFCO. 10a. Edición, U.S.A. 1986.
- 44.- Manual de Procedimientos de Laboratorio y de Productos BBL. Division Becton, Dickinson and Company. 5a. Edición. U.S.A. 1974.