

Genomas de microorganismos y diagnóstico molecular

Gonzalo Osorio A.¹

Resumen

En este artículo se exponen los principales descubrimientos de la nueva ciencia denominada genómica y sus principales repercusiones para el diagnóstico microbiológico, tales como la nueva tecnología de los ADN chips.

(**Palabras clave:** gen, genómica, ADN, microorganismos.)

Microbial genomes and diagnosis

This article explores the principal discoveries of the science of genomics, placing emphasis on those related with DNA microassays and microbiological diagnosis.

(**Key words:** gen, genomic, DNA, microorganisms.)

INTRODUCCIÓN

El año 1995 marcó un hito en el desarrollo de las ciencias biológicas, pues en dicha oportunidad fue secuenciado el genoma completo de la bacteria *Haemophilus influenzae*, primer ser viviente de vida autónoma cuyo patrimonio genético era totalmente develado (ya se conocía desde hacía varios años la secuencia completa del material genético de algunos virus). Rápidamente fueron apareciendo genomas de otros microorganismos, entre ellos el genoma del primer eucarionte, el hongo levaduriforme de la cerveza *Saccharomyces cerevisiae*. En 1998 era dada a conocer la secuencia completa del primer organismo multicelular, el nematode *Caenorhabditis elegans*. El genoma de la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* fue publicado en marzo del presente año y la primera versión del genoma

humano apareció el recién pasado mes de junio, abriéndose así una nueva era para la biología y ciencias médicas del siglo 21¹.

GENOMAS DE MICROORGANISMOS PATÓGENOS

El genoma de un organismo está definido como el conjunto de todos sus genes. Cada gen está conformado por una secuencia lineal de bases nucleotídicas cuyas denominaciones son adenina, timina, citosina y guanina (A, T, C y G, respectivamente). La secuencia total del genoma corresponde entonces a la secuencia lineal de todos los genes que constituyen dicho genoma. Actualmente se ha completado la secuencia de alrededor de 30 genomas de organismos procarióticos, muchos de ellos importantes patógenos humanos como: *Neisseria meningitidis*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Chlamydia* sp., *Mycoplasma* sp. (tabla 1). Muchos genomas de otros destacados microorganismos patógenos están próximos a ser finalizados. Toda esta información ha pasado a integrar bases de datos públicas de libre acceso vía Internet y sin costo alguno para el usuario².

1. Médico-Cirujano, Doctorado en Ciencias Biomédicas. Programa de Microbiología & Micología, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

Correspondencia a Dr. Gonzalo Osorio: e.mail: gosorio@canela.med.uchile.cl.

Tabla 1

Microorganismos patógenos cuya secuencia genómica se ha finalizado a fecha julio del año 2000

Microorganismo	Tamaño genoma (Mbp*)	Año de publicación
<i>Bacillus subtilis</i>	4.20	1997
<i>Borrelia burgdorferi</i>	1.44	1997
<i>Campylobacter pylori</i>	1.64	2000
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	1.23	1999
<i>Chlamydia trachomatis</i>	1.05	1998
<i>Escherichia coli</i>	4.60	1997
<i>Haemophilus influenzae</i>	1.83	1995
<i>Helicobacter pylori</i>	1.66	1997
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	4.40	1999
<i>Mycoplasma genitalium</i>	0.58	1995
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	0.81	1996
<i>Neisseria meningitidis</i>	2.27	2000
<i>Rickettsia prowazekii</i>	1.10	1998
<i>Treponema pallidum</i>	1.14	1999

* Mbp: 10⁶ pares de bases.

La información obtenida de esta forma puede ser utilizada para mejorar sustancialmente el diagnóstico de varias enfermedades infecciosas, por ejemplo, posibilitará identificar mutaciones o segmentos génicos comunes para cada patógeno o grupo patógeno (polimorfismos genéticos) y que no se encuentren presentes en otros grupos. Tales secuencias serán patognomónicas para indicar infección por dichos microorganismos. Se podrá entonces diseñar partidores para PCR (reacción en cadena de la polimerasa) o sondas de hibridación específicas para identificar cada microorganismo en estudio. Otras técnicas genéticas como el RAPD (ADN polimórfico amplificado al azar), RFLP (poliformismo de tamaño de fragmentos de restricción), y campo pulsado, entre otras, se robustecerán y ampliarán con los nuevos descubrimientos. Particularmente, la técnica genética de los llamados chips de ADN, en pleno desarrollo actual, tendrá a futuro un papel preponderante.

ADN CHIPS

Esta técnica se basa esencialmente en un soporte artificial de un tamaño aproximado entre 2-4 cm², donde podemos unir orde-

nada y separadamente moléculas de ADN de diferentes secuencias nucleotídicas, en un número aproximado entre 10 000-400 000 dependiendo del tipo de chip empleado³⁻⁵. Cada uno de estos chips se utiliza entonces como patrón de hibridación, esto es, como sitio de unión de una sonda mediante complementariedad de bases (A/T y G/C). El ácido nucleico que se utilizará como sonda debe marcarse, ya sea por métodos radiactivos o por métodos colorimétricos no-radiactivos. La sonda marcada es aplicada entonces al chip, permitiendo la hibridación y luego se deben realizar varios lavados para eliminar las moléculas de sonda que se unieron inespecíficamente. Como resultado de tal procedimiento se obtendrán cientos de manchas de hibridación que revelan que en dicho sitio se unió específicamente la sonda empleada. La lectura se realiza mediante un dispositivo conectado directamente a un computador que indica la intensidad de cada mancha de hibridación, y por lo tanto indirectamente el grado de identidad entre la sonda empleada y las moléculas de ADN que conforman el chip. Por ejemplo, se puede diseñar un chip que contenga segmentos de ADN de 25 nucleótidos de largo sintetizados in situ aleatoriamente en un número aproximado de 50 000 fragmentos di-

ferentes (tecnología Affymetrix). Una muestra clínica de un paciente con shock endotóxico podrá entonces utilizarse para aislar el agente, obtener su material genético, marcarlo e hibridar dicho material con el chip anteriormente descrito. Rápidamente y sin necesidad de secuenciar el genoma completo del microorganismo podremos obtener un patrón de hibridación genómico característico, compararlo con una base de datos, e identificar la especie y cepa de microorganismo involucrado con un alto nivel de confianza. Otros ADN de diferentes microorganismos o de distintas cepas diferirán en el patrón de hibridación obtenido, indicando así la existencia de diferencias a nivel de diversos segmentos genéticos. Tales chips de ADN ya se encuentran disponibles en el comercio para varios microorganismos.

Por otra parte, dado el avance vertiginoso del área genómica ya ha comenzado el desarrollo paralelo de la llamada área postgenómica o proteómica. Esta área consiste en identificar primero el conjunto de proteínas que conforman una célula viviente y luego entender cómo este conjunto de proteínas interactúan entre sí *in vivo*, con el fin de poder desentrañar los mecanismos de respuesta celular frente a variadas condiciones ambientales, tales como: temperatura, estrés ácido, presencia de sustancias tóxicas, etc. El conocimiento de proteínas de microorganismos patógenos que sean úni-

cas para él o que se expresen solo cuando este entra en contacto con su hospedero, será también un gran aporte al área del diagnóstico molecular. Se podrán diseñar técnicas que detecten anticuerpos contra proteínas específicas para ciertos microorganismos y que se expresen únicamente *in vivo*, con el objetivo de disminuir posibles reacciones cruzadas con otros antígenos.

Seguramente todas las técnicas de diagnóstico microbiológico basadas en secuencias de ácidos nucleicos y proteínas de microorganismos tendrán a corto plazo un desarrollo explosivo y de consecuencias enormes para el diagnóstico microbiológico molecular y por ende para el beneficio de la medicina. El siglo 21 le abre sus puertas a una nueva biología, más globalizante, con una visión holística del fenómeno viviente y con insospechados fenómenos aún por descubrir.

REFERENCIAS

1. Lander ES, Weinberg RA: Genomics: journey to the center of biology. *Science* 2000; 287: 1777-82.
2. TIGR Microbial Database: <http://www.tig.org/tdb/mdb/mdbcomplete.html>.
3. Young RA: Biomedical discovery with DNA arrays. *Cell* 2000; 102: 9-15.
4. Gerhold D, Rushmore T & Caskey CT: DNA chips: promising toys have become powerful tools. *Trends Biochem. Sci* 1999; 24: 168-73.
5. Affymetrix Inc.: <http://www.affymetrix.com>.

AVISO A LOS AUTORES

Los autores que deseen enviar sus trabajos en disquete deben hacerlo en disco flexible 3,5" de alta densidad, PC compatible, escrito en Word-Perfect o MS Word, además de 2 copias impresas. Recordamos que el uso de disco permite agilizar el proceso editorial al que es sometida cada publicación.