

## ¡ YA SÉ QUIÉN ERES, MICROORGANISMO !

Jorge Rosales Bermejo

Las bacterias son organismos haploides que se reproducen de forma clonal y rara vez someten sus genomas al proceso de recombinación. Estos microorganismos son ubicuos, capaces de sobrevivir y desarrollarse en prácticamente la totalidad de los hábitats existentes en el planeta. Además cada vez adquieren mayor importancia para aplicaciones ambientales, industriales y agrícolas: se utilizan cepas específicas, seleccionadas y manipuladas, para la biorremediación en zonas contaminadas; para aplicaciones industriales como la producción de enzimas, manufacturación de plásticos, producción de combustibles y compostaje; en agricultura se emplean para promover el crecimiento vegetal, potenciar la fijación de nitrógeno y en el control biológico de plagas.

El aumento de la explotación de bacterias beneficiosas y la necesidad de controlar patógenos bacterianos ha ido acompañado de la necesidad de avances biológicos y tecnológicos en el área de la identificación y clasificación bacteriana. La determinación de la diversidad genética dentro de las poblaciones microbianas es clave para establecer una taxonomía estable, que una vez se ha establecido permite idear protocolos de identificación y de diagnóstico de enfermedades; los nuevos aislados pueden ser rápidamente caracterizados y los grupos de cepas problemáticas pueden ser ubicados taxonómicamente. Centrándonos en el aspecto agrícola, un ejemplo de la diversidad existente y la necesidad de obtener un buen método de clasificación sería el género *Xanthomonas*, que engloba cepas fitopatógenas sobre 120 especies de monocotiledóneas y 260 de dicotiledóneas, incluyendo cultivos de gran importancia económica. Una de estas especies, *X. campestris*, engloba a su vez a 140 patovares que no se diferencian fenotípicamente entre sí salvo por su rango de hospedador. Otro ejemplo puede ser la especie *Pseudomonas syringae*, que se halla subdividida en 50 patovares [Dawson S.L. et al, *Journal of Microbiological Methods* **50**:9-22(2002)]; este sistema de clasificación en patovares se adapta a las necesidades prácticas de los patólogos vegetales pero no refleja necesariamente las relaciones genéticas reales entre las cepas.

Se ha empleado una gran variedad de métodos para llevar a cabo la clasificación bacteriana, entre otros, los métodos serológicos (p.e. ELISA), los métodos bioquímicos basados en la utilización de diferentes sustratos (p.e. BIOLOG®), los análisis de ácidos grasos (FAME) o los análisis de isoenzimas

(p.e. MLEE). Sin embargo la llegada de la biología molecular ha causado un cambio significativo en el tipo de herramienta utilizada, permitiendo una caracterización y clasificación mucho más rápida y fiable. Los protocolos que analizan ácidos nucleicos reducen el tiempo utilizado, parecen producir resultados más estables y repetitivos, con frecuencia reflejan más fielmente las relaciones filogenéticas y son útiles para ordenar las cepas en grupos coherentes. De hecho, la determinación de género y especie microbiana está basada aún en los métodos de hibridación DNA-DNA y en el caso de microorganismos no cultivables en los análisis de la secuencia del rDNA 16S y la comparación con sus “vecinos” más cercanos filogenéticamente, los que han proporcionado conocimientos sobre su biología y ecología [Louws F.J. et al, *Annu. Rev. Phytopathol.* **37**:81-125(1999)]. Otras técnicas basadas en el DNA, incluyen la digestión del DNA total mediante endonucleasas que cortan de forma frecuente (REA) o infrecuentemente (PFGE, FIGE) los perfiles plasmídicos, los análisis de polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) y el análisis de los genes rDNA 16S. Estas técnicas son habitualmente utilizadas para obtener información para la clasificación dentro de los niveles de especie, subespecie y cepa (Figura 1).

En cualquier caso, muchos de los métodos moleculares para la clasificación e identificación de cepas están basados en la amplificación del DNA mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), empleándose básicamente dos tipos de aproximaciones:

La primera implica la amplificación de uno o pocos fragmentos de DNA específicos, tales como partes del operón de rRNA, seguido de un análisis de restricción (ARDRA). Los nuevos fragmentos producto del análisis de restricción son resueltos en geles de electroforesis, generando un patrón de bandas de restricción de ácidos nucleicos característicos para cada cepa. Además la información obtenida de la secuencia del DNA sobre una región o gen en particular ha permitido la amplificación de fragmentos específicos de DNA que sirven para diagnosticar géneros, especies o cepas.

La segunda técnica hace uso de oligonucleótidos que actúan a modo de cebadores inespecíficos para la amplificación de numerosos fragmentos diferentes de DNA genómico. Cuando estos fragmentos son separados electroforéticamente por tamaño, los patrones de bandas resultantes generan una “huella dactilar” específica para cada grupo de microorganismos. Dentro de este tipo de protocolos

se pueden diferenciar técnicas en función de los cebadores empleados, como cebadores cortos de secuencia arbitraria (RAPDs), o cebadores más largos en combinación con temperaturas de

alineamiento más bajas (AP-PCR); o bien basados en la presencia natural de elementos repetitivos de DNA esparcidos por el genoma de gran parte de las bacterias, utilizándolas como molde para la amplificación del DNA genómico (rep-PCR), el uso de

tres familias de secuencias repetitivas cuya función exacta es desconocida: secuencias palindrómicas extragénicas repetitivas (REP), secuencias consenso repetitivas intergénicas de enterobacterias (ERIC) y el elemento BOX.

Todas estas técnicas, basadas en el uso de la técnica PCR, permiten la amplificación selectiva

de las distintas regiones genómicas localizadas entre ellas y que al resolverse electroforéticamente generan la huella dactilar del microorganismo, pudiendo detectarse diferencias genéticas incluso

entre cepas de la misma especie bacteriana (Figura 1). De esta manera se ha conseguido visualizar la huella dactilar de un microorganismo, de la misma manera que se usa un código de barras en los comercios.

A partir de este momento,

para localizar la presencia de una determinada especie o cepa, o bien para agrupar distintos microorganismos relacionados, sólo habrá que visualizar la huella dactilar de cada microorganismo. Ya ninguno tendrá escapatoria ... y todos serán reconocidos por los investigadores.

Familia	Genero	Especie	Subespecie	Cepa
Secuenciación del DNA				
Secuenciación del rDNA 16S				
ARDRA. tRNA-PCR				
RFLP. PFGE				
RAPDs. AP-PCR. rep-PCR				

Fig.1 Esquema comparativo del nivel de resolución filogenética de diversas técnicas moleculares.

## PROGENITORES CLONALES MULTIPOTENTES PARA LA REPARACIÓN DEL SISTEMA NERVIOSO

Ramón Muñoz-Chápuli

Probablemente uno de los temas científicos del año que acaba de empezar sea el de las investigaciones sobre la utilización de células madre con fines terapéuticos, un tema que no está libre de una fuerte polémica. Opiniones a favor y en contra se suceden en los medios de comunicación, pero lo que parece fuera de toda duda es la importancia de que sepamos explotar adecuadamente las propiedades de las células pluripotentes para solucionar graves problemas de salud. Por citar sólo un caso, el envejecimiento de la población en los países occidentales va a aumentar en los próximos años la incidencia de enfermedades neurodegenerativas, algunas de las cuales no tienen hoy por hoy tratamiento curativo.

En el debate sobre las células madre se olvida en ocasiones que existen alternativas a las células embrionarias que no deberían generar

inconvenientes desde el punto de vista ético. Una serie de descubrimientos recientes ilustran bien este punto, y vamos a referirnos a ellos en este artículo. Se trata de resultados espectaculares, aunque su auténtico alcance sólo podrá verificarse en los próximos años.

La historia comienza hace diez años. El grupo de Evan Snyder, en la Escuela Médica de Harvard, desarrolló una línea celular, denominada C17.2, inmortalizando células de la capa granular externa del cerebelo de ratones recién nacidos mediante transducción, mediada por retrovirus, del oncogén *v-Myc* [Snyder EY et al., *Cell* **68**:33-51 (1992)]. Este gen es el equivalente en aves del proto-oncogén *c-Myc*, que en mamíferos está implicado en el control de la proliferación y diferenciación celular. Las células C17.2 no son auténticas células-madre, aunque comparten con ellas la capacidad de generar