

Un viaje por el mundo de los microbios

José Esteban García de los Ríos
Doctor en Ciencias Biológicas
Universidad CEU San Pablo

Festividad de la Inmaculada Concepción
Diciembre de 2006

Facultad de Farmacia
Universidad CEU San Pablo

Un viaje por el mundo de los microbios

No está permitida la reproducción total o parcial de este trabajo, ni su tratamiento informático, ni la transmisión de ninguna forma o por cualquier medio, ya sea electrónico, mecánico, por fotocopia, por registro u otros métodos, sin el permiso previo y por escrito de los titulares del copyright.

Derechos reservados © 2006, por José Esteban García de los Ríos
Derechos reservados © 2006, por Fundación Universitaria San Pablo-CEU

CEU Ediciones
Julián Romea, 18 - 28003 Madrid
<http://www.ceu.es>

ISBN: 84-86117-78-X
ISBN: 978-84-86117-78-8
Depósito legal: M-51623-2006

Compuesto e impreso en el Servicio de Publicaciones de la Fundación Universitaria San Pablo-CEU

¡Adelante, jóvenes guerreros! ¡Amplia es la carrera, y copiosa la provisión de laureles: microbios de la endocarditis y de la angina de pecho; microbios de la torticollis y de la orquitis; microbios de la clorosis y de la anemia; microbios de los pies zambos (varo y valgo, equino y talo), microbios de las luxaciones y fracturas; microbios de toda enfermedad interna y externa, física y moral; microbios de Sodoma, de Lesbos, microbios de toda locura y de toda manía, orugas de todas las linfas, arañas de todos los techos!

¡Adelante, valientes soldados! No os detengáis si el camino es bueno; daos prisa en concluir vuestras conquistas; pues, si queréis volver a ser médicos después, os asombrareis al comprobar que la neumonía y el reumatismo, la viruela y la fiebre tifoidea, el garrotillo y el cólera y todas las demás enfermedades internas y externas, físicas o morales, tienen todavía los mismos síntomas y la misma evolución, la misma duración y el mismo pronóstico que antes de vuestra partida hacia la guerra microbiana. Y aunque no se muere más, sí se muere tanto y con la misma facilidad.

Victor Macrobius¹

Magnífico. y Excmo. Sr. Rector, Excmo. Sr. Vicerrector, Ilmos. Decanos, Excmas. e Ilmas. Autoridades, queridos compañeros, alumnos, familiares y amigos:

Es para mí un honor cumplir este encargo que en nombre de la Facultad me ha hecho nuestro Decano para que os sirva de acompañante por este pequeño recorrido que haremos por el Mundo de los Microbios. No pretendo que el viaje sea exhaustivo, sino que haremos unas pocas paradas, como cuando nos llega un visitante a Madrid y en un día quiere que le enseñemos el Prado y el Reina Sofía.

¹ Giordan G., Raichvarg D., Drouin J.M., Gagliardi R. y A.M. Canay. 1988. Conceptos de Biología. 111. Editorial Labor-MEC. Se refieren a una obra (*Malades, médecins et pharmaciens*) firmada en 1889 por Victor Macrobius, seudónimo opuesto a microbio, perteneciente a un antipasteuriano, que se burla de la carrera de la época por conseguir la asociación de enfermedades a microorganismos.

1. El porqué de este viaje

En este viaje haremos un breve recorrido por los aspectos que considero principales de la Microbiología. Nunca me apartaré de la Historia de la Microbiología, puesto que ella es la que nos ha traído a la situación en la que nos encontramos en cada momento. El conocimiento de las personas que nos han precedido en el desarrollo de la ciencia, sus esfuerzos, su entusiasmo y su búsqueda de la verdad, es muy importante para despertar el amor a la ciencia por parte de los estudiantes que nos sucederán. Y lo digo convencido, con pruebas. No en vano, a mi primer profesor de Ciencias Naturales, el Dr. D. Florencio Bustinza, amigo y biógrafo de Fleming², le doy un gran papel en el despertar de mi temprano interés por la Naturaleza, en general, y la Microbiología en particular. Todos los años, en el aniversario de Fleming, organizaba un homenaje en el que nos contaba detalles de su amistad y de la vida del descubridor de la penicilina. Este hecho sucedía tanto en el madrileño Instituto Cardenal Cisneros, como en la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid. Como bien dijo Goethe: La Historia de la Ciencia es la Ciencia en sí misma.

Desde aquellos tiempos heroicos de Fleming hasta nuestros días, se han realizado notables avances en nuestro conocimiento de los fenómenos biológicos. La Microbiología ha progresado paralelamente a ellos y muchas veces la investigación microbiológica ha ocupado el primer lugar en los progresos conseguidos. El campo en el que nos movemos es muy amplio, por lo que mi aproximación al concepto de la Microbiología será subjetivo, tratando de resaltar, sin ser exhaustivo, mis inquietudes y las que creo que merecen ser destacadas a los estudiantes de las distintas titulaciones de esta Universidad, de cuya formación somos responsables. No obstante yo no me quiero limitar, y no me limito, sólo a los estudiantes, sino que mi vocación divulgadora me lleva mas allá, a hacer llegar el conocimiento de la ciencia a la sociedad en general. De hecho, la Microbiología en la actualidad, se niega a verse recluida en el laboratorio, el aula, el seminario o la biblioteca. La sociedad está siendo bombardeada continuamente con información científica o pseudocientífica y nosotros debemos cumplir también la misión de ayudar a digerir toda esa información. Además, a los ciudadanos les preocupan otros temas que no son científicos, como los políticos o los económicos. Conocer los detalles de todo es prácticamente imposible, aunque tampoco es necesario. Ahí está la función del divulgador de dar a conocer las mínimas bases para entender un

² Bustinza F. 1961. Diez años de amistad con Sir Alexander Fleming. Editorial MAS.

fenómeno científico. Esta labor hay que llevarla a cabo con mucho cuidado para no llevar la ciencia al nivel de levedad y superficialidad tan impuesto hoy en nuestra sociedad. Como decía Aldoux Huxley³: *"La omisión y la simplificación nos ayudan a comprender, pero, en muchos casos, nos ayudan a comprender lo erróneo, pues nuestra comprensión puede ser únicamente de las nociones pulcramente formuladas por quien abrevia, no de la vasta y ramificada realidad de la que esas nociones han sido arbitrariamente abstraídas... La abreviación es un mal necesario y la misión del abreviador consiste en sacar el máximo provecho..."* Es decir, tenemos que aprender a simplificar, pero sin llegar a caer en la falsificación, sin prescindir de un número excesivo de cuestiones accesorias que condicionan la realidad.

Según Fernández-Rañada⁴, las razones que nos pueden llevar a difundir la ciencia fuera del ámbito puramente académico las podemos resumir en:

- Éticas (debemos hacerlo)
- Egoístas (nos conviene)
- Estimulantes (es divertido hacerlo)

ENTREVISTA A SANTIAGO CRISOLÁ

NO PUEDE VIVIR AISLADO DE LA SOCIEDAD PARA LA QUE TRABAJA

"El investigador debe comunicar su labor"

→ Promover la investigación, desde las instituciones y consultar los logros científicos e innovaciones con los actores en los que hay que incidir, según Santiago Crisolá, presidente del Consejo Valenciano de Científicos.

¿Por qué razón debemos investigar la ciencia?

Ética (debemos hacerlo)

Egoístas (nos conviene)

Estimulantes (es divertido hacerlo)



³ Huxley A. 1984. Nueva visita a un mundo feliz. 7-8. Seix Barral

⁴ Fernández-Rañada A. 2003. Los muchos rostros de la ciencia. 157-158. Fondo de Cultura Económica.

Las de tipo ético, porque conocemos el trasfondo técnico de muchas cuestiones importantes para la sociedad y que son difíciles de comprender para muchas personas. Hay razones de tipo egoísta porque en nuestro trabajo dependemos de la atención de la sociedad y, a veces, nos quejamos de la falta de interés que ésta tiene en la ciencia. Necesitamos explicar lo importante de nuestro trabajo a políticos, empresarios o colegas de otras disciplinas de los que dependemos para la asignación de fondos. La tercera razón que nos lleva a acercarnos a otros sectores sociales, es que es divertido hacerlo. Los científicos, en general, y los microbiólogos, en particular, solemos disfrutar mucho con nuestro trabajo. ¿Por qué no seguir disfrutando con la divulgación?

Estas razones, pero fundamentalmente la tercera es la que me ha llevado a mi vocación de divulgador de la Microbiología en varios ámbitos:

- En la propia Facultad tratando temas fuera de programa.
- Ante el mundo universitario, sea de ciencias o de letras, y ante los medios de comunicación, tratando temas de actualidad.
- En Institutos de Bachillerato o Centros Culturales Municipales, participando en diversas Jornadas (Zoonosis, Micológicas, por la Paz, Día del Medio Ambiente, Semana de la Ciencia...).

Los temas desarrollados no han sido los grandes Temas Estrella de la ciencia, que tanto éxito tienen (el origen de la vida, el big bang, el cambio climático, la extinción de los dinosaurios...), pero después de exponerlos han resultado suficientemente interesantes como para ser solicitados y tener que repetirlos en varios sitios.

2. La Microbiología

La Microbiología es el estudio de los microorganismos y sus actividades. Los microorganismos aludidos en esta definición son seres vivos microscópicos, no visibles a simple vista. Este hecho ha condicionado la aparición y consolidación tardía de la Microbiología como ciencia, puesto que, aunque ya a finales del siglo XVII (Anton van Leeuwenhoek, 1683⁵) se habían visto los microorganismos, hubo que esperar dos siglos más para llegar a lo que se ha dado en llamar *La Edad de Oro de la Microbiología*. Es entonces cuando el estudio de los microorganismos

⁵ van Leeuwenhoek A. 1684. "An abstract of a Letter from Mr. Anthony van Leeuwenhoek at Delf, dated Sep. 17, 1683". *Phil. Trans. Roy. Soc. London*. 14: 568-574.

alcanzó el auge que había de conducir hasta su actual expansión. Es curioso que, siendo los microorganismos los primeros seres vivos que aparecen en el planeta Tierra, los más abundantes, los más ubicuos, los que han tenido una enorme influencia en la Historia de la humanidad, etc, hayan sido los últimos en ser objeto de estudio. No obstante, pocas ciencias, en las últimas décadas, han crecido y han cambiado tanto como la Microbiología.

El retraso que hay desde que se descubren los microorganismos hasta que se establece la Microbiología como ciencia independiente se debe a la propia situación temporal en la que ocurre el hecho, ya que faltaban las técnicas adecuadas para el estudio de los microorganismos. A. van Leeuwenhoek era contemporáneo y paisano de Jan Vermeer en Delf, Holanda, del que se dice que pudo emplearlo como modelo en dos de sus cuadros más representativos: El Geógrafo y El Astrónomo. Cuando Robert A. Thom, en 1966, recrea la forma en la que van Leeuwenhoek hacía sus observaciones, lo sitúa en el mismo estudio en el que Vermeer pintó los dos citados cuadros.



El Geógrafo, Jan Vermeer (1668)



A. van Leeuwenhoek, Robert A. Thom (1966)

A lo largo de los dos siglos posteriores al descubrimiento de los microorganismos, se plantearon varios problemas en relación con ellos cuya resolución llevó a una nueva ciencia firmemente establecida, con unos contenidos bien diferenciados y con unas amplísimas perspectivas de desarrollo. Entre estos problemas podemos destacar los tres que más contribuyeron al establecimiento de la Microbiología:

- La controversia sobre la generación espontánea, que trataba de establecer

cual era el origen de aquellos microorganismos que aparecían en un medio originalmente exento de ellos. El problema fue resuelto principalmente por L. Pasteur.

- La posible participación en las enfermedades infecciosas, que llevó a la asociación de cada enfermedad a un microorganismo concreto, según demostró R. Koch con sus postulados.
- El papel de los microorganismos en las fermentaciones, en cuyo estudio participaron Cagniard-Latour, Schwann, Kützing y Pasteur.



Louis Pasteur



Robert Koch

La búsqueda de las fuentes de cualquiera de estos temas nos puede llevar, no solo al mayor conocimiento de cómo se fueron resolviendo, sino que supone una de las más gratas y divertidas aventuras con las que disfrutar de la lectura. Aparte de eso, con nuestro conocimiento actual podemos dar explicación a algunos hechos que entonces no la tenían. Como los ejemplos son muchos y variados, nos referiremos a uno concreto: el estudio del cólera por R. Koch⁶.

Al año siguiente de la presentación del agente etiológico de la tuberculosis por parte de R. Koch, en 1883, el cólera, enfermedad propia de Asia, se había acercado peligrosamente a Europa, desencadenándose una epidemia en Egipto. Como

⁶ Kruif P. 1976. Cazadores de Microbios. Editores Mexicanos Unidos S.A.

el microorganismo causante de la enfermedad era desconocido, rápidamente, los principales grupos de investigadores en la materia se movilizaron para la identificación del enemigo. Por parte alemana, Robert Koch partió hacia Egipto acompañado de Gaffky. Por parte francesa, Pasteur envió a Roux y Thuiller, de los cuales, el último no regresaría, siendo víctima de la enfermedad que trataba de estudiar.

En aquella epidemia, Koch llegó a ver el mismo microorganismo en todos los casos de la enfermedad, pero no llegó a demostrar que se trataba del culpable del cólera. Por ello solicitó que le enviaran a la India a continuar con sus investigaciones. Koch viajó a Calcuta, esta vez acompañado por 50 ratones, el material necesario para su trabajo, y la ilusión, suponemos, por conseguir la demostración que buscaba. Consiguió, efectivamente, encontrar el mismo microorganismo que en Egipto, en forma de coma, en todos los cadáveres que iba examinando. Cultivó al bacilo en caldo y descubrió la transmisión a través del agua contaminada. Cuando regresó a Alemania, fué condecorado por el Emperador, en justa recompensa por el trabajo desarrollado.

Pero la vieja escuela médica alemana todavía era escéptica sobre estos descubrimientos. Concretamente, el profesor Max von Pettenkofer (1818-1901), fundador del primer Instituto de Higiene en Munich, que no creía que aquellos minúsculos bacilos fueran los responsables del cólera, solicitó a Koch sus microbios para demostrar que no producían la enfermedad. Cuando Koch le envió un tubo lleno de bacilos, Pettenkofer se los tomó, demostrando, según él, que había ganado la apuesta: los microorganismos no causan el cólera, lo que importa es la predisposición del individuo. Bueno, sus razones tendría, porque, de hecho, no enfermó.

Pettenkofer siguió defendiendo que los microorganismos no causaban el cólera, sino que la enfermedad se debía al estado del paciente. Koch, por el contrario, decía que sin el bacilo no podía haber cólera.

A la luz de nuestros conocimientos actuales, podemos afirmar que ninguno de los dos tenía razón y que, simultáneamente, los dos la tenían. A pesar de que una gran parte de la población esté expuesta al patógeno, solo una minoría adquiere la enfermedad, que ahora podemos relacionar con la malnutrición.

Nos podemos imaginar al Dr. Pettenkoffer, de Munich por más señas, como un bien alimentado bávaro (no bárbaro, sino de Baviera), al que no faltarían sus salchichas, codillo, sauerkraut y su cerveza muniquesa. Bueno, a lo mejor nos

estamos equivocando en nuestra apreciación y el Dr. Pettenkofer era un austero médico vegetariano. Pero, sea como sea, seguro que comía todos los días con regularidad, porque esta es, y no otra, la clave de su supervivencia a la ingestión del bacilo del cólera.



Max von Pettenkofer

Efectivamente, el *Vibrio cholerae*, que es así como conocemos actualmente al microorganismo causante del cólera, es un microbio que puede vivir libremente en casi todo tipo de aguas, dulces, saladas, residuales, por su tolerancia a diferentes concentraciones salinas. Por el contrario, este bacilo es muy sensible al ácido, por ejemplo, al ácido de un estómago normalmente alimentado. Así, una dosis microbiana que puede ser infecciosa para un paciente mal alimentado, con su estómago poco activo, con poco ácido, no lo será para un individuo bien alimentado, con bastante ácido en su estómago, como suponemos que sería el caso del Dr. Pettenkofer.

Por eso, de toda la población mundial, solo los mas desfavorecidos desarrollan la enfermedad, el cólera está claramente asociado a la geografía del hambre: India (con sus bombas), Pakistán (con sus bombas), Bangla Desh, etc. en Asia; Africa Central y Subsahariana, y, en los últimos años, países de Centroamérica y Sudamérica.

¡Que curioso! En todas estas regiones hay enormes riquezas (no repartidas), endémicas guerras (con dilapidación de riqueza), o las dos cosas al mismo tiempo. Además, en estos últimos años estamos asistiendo al grandioso espectáculo de las demostraciones de poderío nuclear y de posesión de cohetes de algunas de las naciones con cólera endémico, y los pueblos sufridores apoyando con fervor patriótico a sus regímenes nucleares.

A medida que se iban resolviendo problemas en relación con los tres grandes temas citados (enfermedades infecciosas, generación espontánea y fermentaciones), iban surgiendo nuevos campos de estudio, como ocurre con cualquier ciencia experimental:

- La inmunidad ante las enfermedades infecciosas: la explicación científica de la variolización y de la vacunación de Jenner...
- Los tratamientos: de las *balas mágicas* de Ehrlich a la penicilina de Fleming...
- La posible existencia de organismos no visibles ni al microscopio: los *virus filtrables*...
- Los microorganismos como agentes geoquímicos: los quimiolitótrofos, los fijadores de N...

El estudio de todos estos campos obligó al desarrollo toda una serie de técnicas nuevas, las que hoy conocemos como técnicas microbiológicas:

- Las técnicas de esterilización: el autoclave, el horno...
- Las técnicas de observación de los microorganismos: el perfeccionamiento del microscopio compuesto, las tinciones...
- Las técnicas de cultivo de los microorganismos: la placa Petri, el agar...

El desarrollo de todas estas técnicas fue lo que condujo al establecimiento definitivo de la Microbiología como una nueva ciencia consolidada.

Aquí también podríamos hacer interesantes y divertidas paradas en cada descubrimiento, pero como tenemos limitaciones temporales solo puedo recomendar a las personas interesadas a que recurran a la lectura de la Historia de la Ciencia para tales divertimentos.

La viruela y la vacuna

La viruela fue una enfermedad exantemática muy grave, de etiología vírica, que existió de forma natural hasta 1977, y que ha tenido un fuerte impacto en la historia de la humanidad. Cuando existía, la viruela se presentaba en dos formas clínicas:

- *La variola major*, la más grave, con una mortandad de un 30-35%, y en la que prácticamente todos los supervivientes quedaban marcados (picados de viruela, como se lee en descripciones literarias) por cicatrices residuales de las pústulas, sobre todo en la cara.

- *La variola minor* (llamada *alastrim* en Latinoamérica), con baja mortandad, de menos de un 1% y ausencia, en general de cicatrices, salvo en un 11% de afectados.

Los virus causantes de ambas formas son indistinguibles desde el punto de vista morfológico.

En China, hace cientos o, posiblemente, miles de años, se practicaba una forma de prevención diferente a la vacuna que en los últimos dos siglos se vino ejerciendo en Occidente. Consistía en pulverizar las costras secas procedentes de los enfermos que habían sufrido la enfermedad e introducir este polvillo por vía nasal.

En Europa, fue Lady Mary Wortley Montagu (1689-1762), esposa del embajador británico en Constantinopla, quién, a su regreso de Turquía, introdujo una práctica diferente, la variolización, consistente en la inoculación, a través de la piel del líquido procedente de pústulas de viruela benigna.

Finalmente, fue Edward Jenner (1749-1823) (Figura 2), el que condujo a la técnica de inmunización que, al ser extendida por todo el mundo, hizo desaparecer una enfermedad infecciosa, por vez primera en la historia de la humanidad. Este médico de Gloucestershire (Reino Unido), observó como las personas que trabajaban ordeñando a las vacas y que habían sufrido una especie de viruela benigna en sus manos, no enfermaban de viruela. Esta observación de Jenner fue llevada a la práctica experimental, en 1796, inoculando al niño James Phipps con líquido procedente de una pústula de la mano de la vaquera Sarah Nelmes. Este niño quedó protegido ante inoculaciones posteriores de auténtica viruela. Este y otros resultados fueron publicados por Jenner en 1798, con el título "*An Inquiry into the Causes and Effects of the Variolae Vaccinae; a Disease Discove-*

red in some of the Western Counties of England, Particularly Gloucestershire, and Known by the Name of The Cow Pox”.

Naturalmente, tratándose de virus, como sabemos hoy, hace dos siglos nadie, ni el propio Jenner, tenía conocimiento de qué tipo de agente era el causante de la enfermedad ni del que inducía la inmunidad, así como el porqué se desencadenaba tal inmunidad.

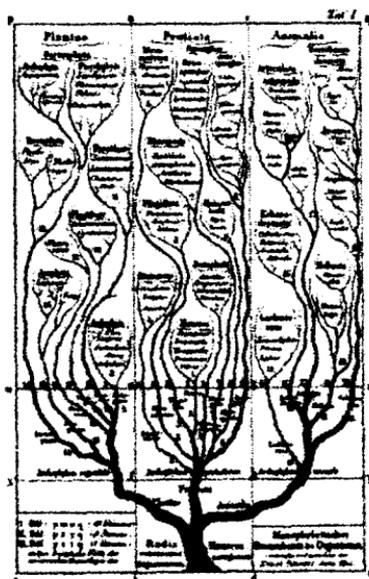
La *vacunación* de Jenner se introdujo en España en poco tiempo, participando en ello una serie de pioneros, destacando Francesc Piguillem (1770-1826), que comenzó esa labor en diciembre de 1800 en Cataluña. Simultáneamente se empiezan a escribir y traducir textos sobre el tema. Destaca el *“Origen y descubrimiento de la vaccina, traducido del francés con arreglo a las últimas observaciones hechas hasta el mes de mayo de 801, y enriquecido con varias notas”*, de Pedro Hernández (1801), del que se hicieron tres ediciones. El texto mas importante, no solo por el contenido, sino por la difusión que llegó a alcanzar, fue el *“Tratado histórico y práctico de la Vacuna”*, traducido por el médico alicantino Francisco Xavier de Balmis en 1803, a partir de la obra de Jacques Louis Moreau de la Sarthe. Esta traducción también fue decisiva a la hora de nombrar a Balmis como Director de la Expedición Filantrópica de la Vacuna¹, que llevó la vacuna a los territorios de ultramar.

¹ Balaguer E. y Ballester R. 2003. En el nombre de los niños. La Real Expedición Filantrópica de la Vacuna (1803-1806). Monografías de la Asociación Española de Pediatría, Madrid.

3. Los microorganismos

Para definir la Microbiología hemos empleado la palabra microorganismo. Los microorganismos son seres vivos microscópicos, frase que no define un taxón biológico claro, con características comunes, mas bien al contrario, puesto que lo único que tienen en común los microorganismos es su tamaño microscópico. Entre ellos nos encontramos seres vivos unicelulares, aunque a veces puedan formar agrupaciones de células, y organismos sin estructura celular: los virus. Desde el descubrimiento de los microorganismos se ha tratado de clasificarlos, empezando por encajarlos en la tradicional división de los seres vivos en los dos Reinos, Animal y Vegetal. Esto ha hecho que varias disciplinas biológicas hayan solapado en el estudio de los microorganismos, hecho que llega hasta la actualidad, puesto que algas y hongos siguen estudiándose en Botánica. Al principio, los Reinos Animal y Vegetal podían separarse de forma clara porque los conocimientos sobre los microorganismos eran escasos. Los hongos presentaban tantas características en común con las plantas que, no teniendo en cuenta su modo de nutrición heterótrofa, se les incluía en el Reino Vegetal. Los protozoos, móviles y depredadores de otros seres mas pequeños, eran incluidos en el Reino Animal. Mas difícil era decidir a qué Reino pertenecerían bacterias, mixomicetos y otros seres unicelulares.

En ese punto es cuando interviene Ernst H. Haeckel (1834-1919) para designar un Tercer Reino (distinto del de los animales y del de las plantas, definidos por Carl Linné) que reunía los actuales procariotas (Haeckel les llama móneras), los protozoos, muchas algas, algunos hongos y hasta algunos animales simples, como las esponjas. El concepto de protisto de Haeckel (1866) es uno de los que se siguen manejando a lo largo del tiempo aunque su significado va variando. Posteriormente, los protistos se dividieron, según su estructura celular, en dos grupos netamente diferenciables: Los protistos superiores se parecían en cuanto a la constitución de las células a las plantas y a los animales. A este grupo pertenecían las algas, los hongos y los protozoos. Los protistos inferiores comprendían las bacterias y las denominadas entonces algas verde-azuladas. Es decir, se estaban diferenciando ya los eucariotas de los procariotas.



La clasificación de E. Haeckel

Mi primer libro de Microbiología, la segunda edición del Pelczar (1966)⁷, se basaba todavía en la 7ª Edición del *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (1957) y admitía cinco divisiones del Reino Vegetal:

- División I. *Protophyta*: Vegetales primitivos, p.ej., bacterias y virus.
- División II. *Thallophyta*: Hongos, levaduras y algas.
- División III. *Bryophyta*: Musgos y hepáticas.
- División IV. *Pteridophyta*: Helechos y equisetales.
- División V. *Spermatophyta*: Plantas con semillas.

En la División *Protophyta* se incluían dos clases, las Bacterias y las Cianofíceas. Las bacterias se definían entonces como *típicas plantas unicelulares*.

Esta edición del *Bergey's* coincidió en el tiempo con los cuatro reinos de Copeland (1956):

- Reino *Mychota*: Organismos sin núcleo, procariotas.

⁷ Pelczar MJ y RD Reid. 1966. Microbiología. McGraw Hill.

- Reino *Protoctista*: Organismos con núcleo, eucariotas no plantas y no animales
- Reino *Plantae*: Plantas
- Reino *Animalia*: Animales

Whittaker (1959)⁸, basándose en las originales características biológicas de los hongos, suficientemente diferentes del resto de los seres vivos, añade un reino más al sistema de Copeland: crea el Reino Fungi, extraído del Protoctista.

- Reino *Monera*: Organismos sin núcleo, procariotas
- Reino *Protista*: Eucariotas no plantas, no hongos y no animales
- Reino *Plantae*: Plantas
- Reino *Fungi*: Hongos
- Reino *Animalia*: Animales

Este sistema de cinco reinos ha sido, y sigue siendo, el más popular de las últimas décadas. Los criterios para la pertenencia a los reinos son:

- El tipo celular, procariota o eucariota.
- El nivel de organización: unicelular solitaria y en colonias u organización multicelular.
- Tipo nutricional: autótrofo o heterótrofo.

Si volvemos a las clasificaciones bacterianas, la siguiente fecha clave es 1974, cuando sale la 8ª Edición del Bergey's⁹. El cambio básico hecho a este nivel en esta edición probablemente se debe mucho a Stanier y van Niel (1962)¹⁰, quienes apuntaban que *la propiedad distintiva de las bacterias y algas verde-azuladas es la naturaleza procariótica de sus células*. Murray (1968) propuso el término *Procaryotae* como un taxón *al más alto nivel*, descrito como *un reino de microbios caracterizado por la posesión de un nucleoplasma desprovisto de proteínas y no separado del citoplasma por una membrana nuclear*. Al mismo tiempo sugiere poner *Eucaryotae* como un taxón al mismo nivel que incluya protistas, plantas y animales.

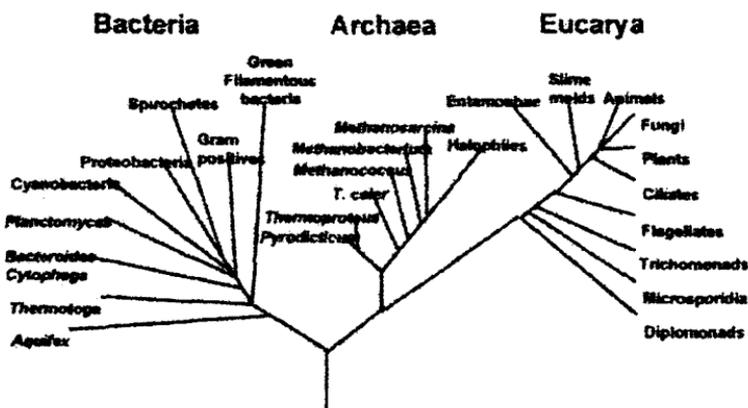
⁸ Whittaker RH. 1959. On the broad classification of organisms. *Q Rev Biol.* 34:210-26.

⁹ Buchanan RE y NE Gibbons. 1974. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th Edition. The Williams & Wilkins Co. Baltimore.

¹⁰ Stanier, RY y CB van Niel. 1962. The concept of a bacterium. *Arch Mikrobiol* 42, 17-35.

En 1984 se empieza a publicar el primer volumen del *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*¹¹, mas completo que el *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. El nuevo *Bergey's* es un manual que comprende todas las especies de procariotas descritas hasta el momento de su publicación. Teniendo en cuenta la fecha en que se publica, deberían haberse basado ya en la secuencia de bases de los genes de los rRNAs, y deberían haber adoptado la clasificación en los tres *dominios* que se consideran actualmente:

- *Bacteria*.
- *Archaea*.
- *Eucarya*.



Los tres dominios de Woese

No obstante, y a pesar de que citan a Woese y Fox (1977)¹², esta primera edición del *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, propone como taxón superior el Reino *Procaryotae*, y las cuatro divisiones artificiales que separarían a las bacterias Gram-negativas, las Gram-positivas, las bacterias sin pared y las actuales arqueas.

Dos discípulas de Robert Whittaker, Lynn Margulis y Karlene Schwartz¹³,

¹¹ Holt JG, Editor, 1984-89. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 1st Ed, Williams & Wilkins, Baltimore.

¹² Woese CR y GE Fox. 1977. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 74(11): 5088-5090

¹³ Margulis L y K Schwartz., 1985. *Cinco Reinos*. Editorial Labor, Barcelona

desarrollaron aún más el concepto de los cinco reinos, que combinaron con los Dominios Procariota y Eucariota, aunque todavía no consideraban el Dominio Archaea:

Dominio *Procarya*

Reino *Bacteria*

Dominio *Eucarya*

Reino *Protoctista*

Reino *Fungi*

Reino *Plantae*

Reino *Animalia*

Llegando a 1990 y gracias, sobre todo, a los trabajos de Woese¹⁴, todas las clasificaciones van adoptando los tres dominios, con algunas variaciones, como la de los cuatro subdominios de Mayr (1990) o los Superreinos, o Imperios, y Reinos de Cavalier-Smith (1998):

Cavalier-Smith considera que las diferencias en la estructura celular y en la organización genética son muy importantes para el establecimiento de la filogenia. Por ello, además de la base de las secuencias de los rRNAs, emplea las características ultraestructurales. Crea dos nuevos reinos de eucariotas:

- *Archezoa*, constituido por organismos unicelulares eucariotas primitivos, como *Giardia*, con ribosomas 70S y sin orgánulos membranosos fundamentales (mitocondrias, cloroplastos, Golgi, peroxisomas).
- *Chromista*, constituido por organismos fotosintéticos con cloroplastos en la luz del retículo endoplásmico rugoso. A este grupo pertenecerían diatomeas, algas pardas, criptomonas y oomicetos.

Así llegamos a la 2ª Edición del *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*¹⁵, que supone una auténtica revolución en la taxonomía bacteriana, que pasa de ser fenética a filogenética. A nivel genético, se basa principalmente en la secuencia de los rRNAs ribosomales para el establecimiento de los taxones superiores. Divide el Dominio *Archaea* en dos Fila y el Dominio *Bacteria* en veintitrés.

¹⁴ Woese, C. R. 1987. Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* 51:221-271.

¹⁵ Garrity GM, Editor, 2001-03, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2nd, Ed., Springer-Verlag, New York

La adopción de los tres dominios de Woese no ha supuesto gran problema entre los microbiólogos no taxónomos, puesto que ya llevábamos mas de dos décadas coexistiendo con la idea. El problema fundamental es digerir que *E. coli* y *Chromatium* pertenecen a la misma clase (γ -proteobacteria) o que *Rickettsia* y *Rhodospirillum* pertenecen a otra (α -proteobacteria) cuando llevaban separadas toda la vida.

3.1. La revisión del árbol de la vida

Con el estudio de cómo han ido evolucionando las clasificaciones biológicas, hemos llegado a las ramas, viendo como entre todos los seres vivos que componen la biosfera, la mayor parte de ellos pertenecen al mundo de los microbios. No solo los dos dominios de procariotas, sino también gran parte de los eucariotas. Además, parece claro que en el origen de todos los seres vivos habría un primer antepasado común universal, que sería, como es lógico, un microorganismo. Esta idea, de que todas las especies han tenido su origen en un grupo menor, que procedería, a su vez, de un conjunto más restringido, y así sucesivamente, tiene su origen en Darwin. Es una idea muy arraigada en el mundo de la Biología, en el que se tiene en mente esa visión darwiniana plasmable en un árbol genealógico, cuya raíz primera y única sería una célula, antepasado de todos los seres vivos¹⁶. Sin embargo, en nuestros días se cuestiona cada vez más este hecho. El origen de la vida, o biopoyesis, pudo producirse en nuestro planeta, varias veces, hace unos 3.850 millones de años¹⁷.

Desde los primeros intentos de filogenia molecular o genética de Emile Zuckerkandl y Linus Pauling (1965)¹⁸ del Instituto de Tecnología de California, hasta los más recientes de Mitchell L. Sogin y Russell F. Doolittle, pasando por las aportaciones de Woese *et al.*, se han ido detectando relaciones genéticas y filogenéticas no siempre atribuibles a la herencia vertical de los caracteres.

Zuckerkandl y Pauling, cambiaron la idea de acudir a los caracteres anatómicos o fisiológicos por la de comparar diferencias en genes o proteínas. Si el fenotipo es el resultado de la expresión del genotipo, cuanto más nos acerquemos al conocimiento del genoma, más cerca estaremos de la auténtica filogenia. Como

¹⁶ Doolittle WF: 2004. Nuevo árbol de la vida. En Biodiversidad. Temas Investigación y Ciencia. Nº35: 12-17. Scientific American.

¹⁷ Guerrero R y M Berlanga. 2003. El planeta simbiótico: Contribución de los microorganismos al equilibrio de los ecosistemas. *Actualidad SEM*. 36: 16-22

¹⁸ Zuckerkandl E y L. Pauling. 1965. Molecules as documents of evolutionary history. *J. Theor. Biol.* 8: 357-366.

los genes mutan, al alejarse las especies de su antepasado común, las secuencias de sus genes irán divergiendo a lo largo de generaciones, de tiempo. Los estudios que se empezaron a hacer con secuencias de proteínas en los años sesenta y setenta, demostraron la validez de la filogenia molecular. Refrendaron, por ejemplo, algunas hipótesis sobre relaciones de algunas bacterias, como el hecho de que las bacterias con fotosíntesis oxigénica constituían un grupo homogéneo, el de las cianobacterias.

A finales de los años sesenta, Carl R. Woese fijó su atención en lo que podría ser un nuevo parámetro de distancias evolutivas, el RNA ribosomal. Siendo genes muy conservados, presentes en todo tipo de células, podrían sufrir un número limitado de variaciones que serían un excelente indicador del grado de parentesco filogenético entre los seres vivos. El número de cambios que va almacenando en su secuencia lo van a convertir en un cronómetro molecular universal.

Desde entonces hasta los años ochenta, los resultados han ido confirmando:

- La separación entre procariotas y eucariotas.
- La hipótesis endosimbionte sobre el origen de mitocondrias y cloroplastos.
- La aparición del tercer dominio (*Archaea*) no menos distante de las bacterias que estas de los eucariotas.

Una vez aceptada la tesis de la división de los seres vivos en tres dominios, quedaba por establecer de cual de los dos grupos primitivos se originó la primera célula eucariótica. Estudiando el mecanismo empleado para la transcripción y la traducción, se concluyó que los eucariotas provenían de las arqueas. Las secuencias de los genomas completos de varias decenas de arqueas y bacterias han venido a confirmar lo mismo. Con todos los datos recopilados se llegó a la estructura del árbol genealógico universal, en el que la vida se desdobló primero en bacterias y arqueas. Seguidamente, procedentes de una arquea, surgen los eucariotas, que incorporaron genes bacterianos, al menos en dos ocasiones, obteniendo las mitocondrias a partir de α -proteobacterias, y cloroplastos, a partir de cianobacterias.

Pero a medida que se van teniendo mas genomas completos de bacterias se van detectando contradicciones con lo dicho mas arriba. Si el árbol fuera correcto, las células eucarióticas solo tendrían genes de origen bacteriano

en el DNA mitocondrial y en el DNA de los cloroplastos, aparte de los que se hayan podido transferir al núcleo procedentes de ambos orgánulos. Los genes transferidos habrían sido los implicados en la respiración o en la fotosíntesis, no los relacionados con otros procesos celulares, que procederían de la arquea ancestral. Sin embargo no ha resultado así y se encuentran genes en el núcleo de eucariotas que provienen, con frecuencia, no solo de arqueas sino también de bacterias. Estos genes de origen bacteriano fueron incorporados directamente a los eucariotas.

Para dar explicación a esta aparente contradicción hay que cambiar el concepto darwinista que teníamos de una evolución con estructura dendriforme y con flujo vertical de información genética. En efecto, las pruebas nos indican, cada vez más insistentemente, de la existencia de una transferencia horizontal.

Por otro lado, hay muchos genes de eucariotas, que difieren de los de bacterias y arqueas conocidas, que no se sabe de donde han venido. Se trata de los genes que codifican la síntesis de los componentes del citoesqueleto y del sistema interno de membranas, distintivos de las células eucarióticas. Sogin y Doolittle piensan que podría haber existido un cuarto dominio, extinguido actualmente, que transfirió horizontalmente los genes de dichos caracteres. De acuerdo con estas hipótesis habría que revisar de nuevo el árbol genealógico.

Sigue siendo válido el esquema de basarnos en las secuencias de los genes de los rRNAs y de las proteínas implicadas en la transcripción y la traducción, que, en principio, se han resistido a la transferencia horizontal. Siempre tendríamos en cuenta que se trataría de la historia evolutiva de una parte del genoma de un organismo.

La representación actual del modelo sería un árbol con una copa ramificada de animales, plantas y hongos pluricelulares. Las asociaciones de bacterias que formaron mitocondrias y cloroplastos se representarían mediante la fusión de ramas principales. Además habría numerosas fusiones adicionales de ramas entre los tres dominios. En la profundidad de los dominios no habría un ancestro sino un conjunto de células primitivas que evolucionarían simultáneamente, darían comunidades distintas que terminarían por originar las tres líneas de descendencia:

Bacteria, Archaea y Eukarya.

3.2. Los virus

Los virus son un extenso y heterogéneo grupo de microorganismos que tienen el carácter común de ser parásitos intracelulares obligados que viven en el interior de células de sus hospedadores específicos. No solo son específicos de una especie (humana, porcina, *Nicotiana tabacum*, *Escherichia coli*...), sino que son específicos de un tipo concreto de células de esa especie (linfocitos T cooperadores humanos, *E. coli* K12...).

Las enfermedades causadas por virus se conocen clínicamente desde hace siglos. Precisamente, ya hemos hablado y volveremos a hablar de cómo el primer método preventivo basado en un virus, la vacuna de la viruela, fue desarrollado antes de que se supiera siquiera que las enfermedades infecciosas tenían origen microbiano.

En 1892, D. Iwanovski había observado que la enfermedad del mosaico del tabaco podía ser reproducida experimentalmente usando el fluido que atravesaba los filtros de porcelana, que normalmente retenían a las bacterias. Este tipo de agentes ultramicroscópicos que atravesaban los filtros de porcelana fueron llamados en principio *virus filtrables*, quedando más tarde su denominación simplemente como *virus*.

En 1898, Loeffler y Frosch descubren los virus animales al comprobar que un virus filtrable es responsable de una enfermedad del ganado: la glosopeda o fiebre aftosa. En 1901 Reed descubre el primer virus humano, el de la fiebre amarilla, y en 1909 Landsteiner y Pope detectan el de la poliomielitis. A comienzos de siglo Copeman desarrolla su técnica de multiplicación de virus animales en embriones de pollo, con la que P. Rous aísla y cultiva el virus del sarcoma aviar (1911).

Curiosamente, los virus más fáciles de obtener y de manipular, los que atacan a las bacterias, fueron los últimos en ser descubiertos. Los virus bacterianos fueron descubiertos en 1915 por F.W. Twort y en 1917 por F. d'Hérelle. A d'Hérelle se debe la denominación de *bacteriófago*, que luego quedó como simplemente *fago*, y varias de las técnicas en el manejo de los fagos que llegan hasta nuestros días: la titulación por la dilución última y el recuento de unidades formadoras de calvas.

Se llegó a pensar que los fagos podrían ser empleados para combatir las enfermedades bacterianas, pero este hecho no se pudo conseguir. No obstante

la contribución de los fagos al avance de la Genética y de la Biología Moleculares, así como a las características generales de la biología de los virus ha sido importantísima. Los primeros estudios cuantitativos sobre la replicación de los virus se realizaron sobre fagos de *Escherichia coli*, lo que suministró modelos aplicables a otros virus, incluidos los de animales.

En 1925, Bordet y Bal describen por primera vez el fenómeno de lisogenia, pero las relaciones entre los ciclos lítico y lisogénico de los fagos no fueron aclaradas hasta los estudios de André Lwoff (1950).

Una de las más importantes contribuciones científicas para la virología fue el descubrimiento de que el virus del mosaico del tabaco era cristalizable (W. Stanley, 1935). Los virus no llegaron a verse hasta 1939, cuando se desarrolló el microscopio electrónico. Por fin, otro importante avance metodológico para el estudio de los virus animales se debió a Enders, Weller y Robbins (1949), que lograron desarrollar por primera vez un método para la multiplicación vírica sobre cultivos de tejidos de mamíferos, técnica que fue perfeccionada más tarde por el equipo de Renato Dulbecco.

Los años sesenta y setenta representaron una auténtica explosión de descubrimientos sobre los virus, incluyendo el continuo descubrimiento de nuevas especies, la relación virus-cáncer, nuevas enzimas, como la transcriptasa inversa... Sin olvidar el hecho de que en esa década (1978) se consigue erradicar la primera enfermedad vírica, la viruela.

Los últimos 30 años y los venideros nos han traído y nos traerán buenas y malas noticias sobre los virus:

- Aparición de nuevas enfermedades emergentes de origen animal: el SIDA, que se está adaptando bien a los nuevos hospedadores humanos; el Ébola, que lo está intentando, y, el que parece más preocupante en fechas recientes, el de la Gripe Aviar, que podría estar preparando el salto de especie.
- Ampliación de las áreas de distribución de los vectores de enfermedades víricas como consecuencia de las alteraciones climáticas.
- El descubrimiento en 1981 por Prusiner de que determinadas enfermedades de mamíferos se deben a partículas proteicas desprovistas de material genético, a las que bautizó como *priones*. ¿Esto es Microbiología?
- Volver a tener que hablar de la viruela, una vez erradicada, debido al

peligro del bioterrorismo.

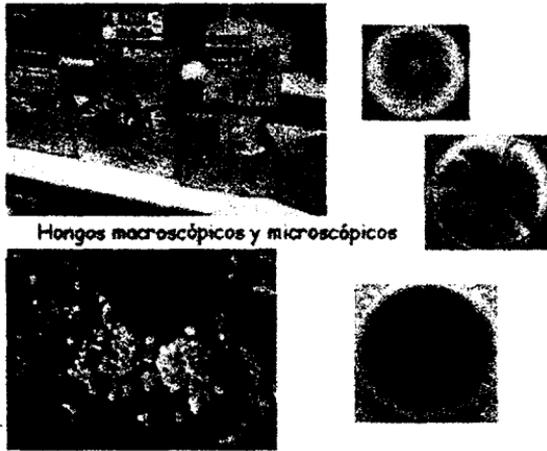
- El diseño de nuevas vacunas recombinantes antivíricas y antitumorales.
- Aplicación clínica de las primeras terapias génicas en humanos recurriendo a vectores víricos.

3.3. Los hongos

Los hongos son un grupo de organismos que constituyen el Reino *Fungi* dentro del Dominio *Eukarya*. La ciencia que estudia los hongos es la Micología. Bien, parece que todo está controlado y perfectamente delimitado, pero ¿a quien corresponde el estudio de los hongos? Respuesta: a los micólogos.

Micólogos son los botánicos que estudian los hongos como si de plantas se trataran, micólogos son los microbiólogos que estudian los hongos microscópicos, micólogos son los biólogos e ingenieros agrónomos que estudian la degradación de la madera, micólogos, en fin, son los que salen los fines de semana otoñales con su cestita a recoger setas y los lunes se reúnen en una de las muchas Sociedades Micológicas para contarse las delicias gastronómicas recogidas.

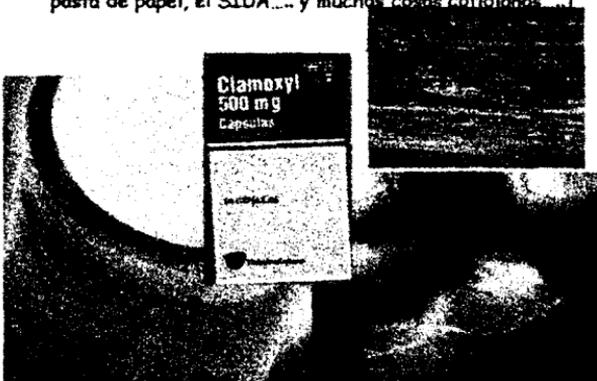
Como subdisciplina de la Microbiología, la Micología se ocupa de estudiar los hongos microscópicos, levaduras y hongos filamentosos, dejando de lado otros que forman estructuras fructificantes macroscópicas, denominadas setas u hongos leñosos. No parece que sea un criterio muy lógico el separar una ciencia por el tamaño de lo estudiado, pero aquí juega un importante papel el hecho de que la metodología empleada en el estudio de los hongos microscópicos coincide en gran medida con la que se usa en el estudio de las bacterias: microscopio, placa petri, tubo, agar, asa de siembra, estufa, autoclave...



Hongos macroscópicos y microscópicos

El Reino *Fungi* está constituido por cientos de miles de especies, hay quien vaticina que llegaremos a millones, de eucariotas heterótrofos (emplean compuestos orgánicos como fuente de carbono). Son *absortivos*, es decir, que toman los nutrientes del medio pasando las moléculas orgánicas en solución a través de la membrana, como las bacterias. La mayor parte de los hongos son saprofitos, ya que sus nutrientes proceden de la materia orgánica en descomposición. La minoría son parásitos y pueden producir enfermedades en las plantas y, muchos menos, en animales y en la especie humana.

Los Hongos
 (o como mezclar los penicilinas, el pié de atleta, la cerveza, la pasta de papel, el SIDA.... y muchas cosas católicas...)



En relación con las plantas, hay tres modos de nutrición, saprotrofia, necrotrofia y biotrofia, según los hongos se alimenten de materiales orgánicos no vivos, de células o tejidos que han sido muertos por el microorganismo, o de células vivas sin dañar, respectivamente¹⁹. Estas categorías no se excluyen mutuamente y algunas especies pueden adoptar cualquiera de estos modos según las condiciones ambientales.

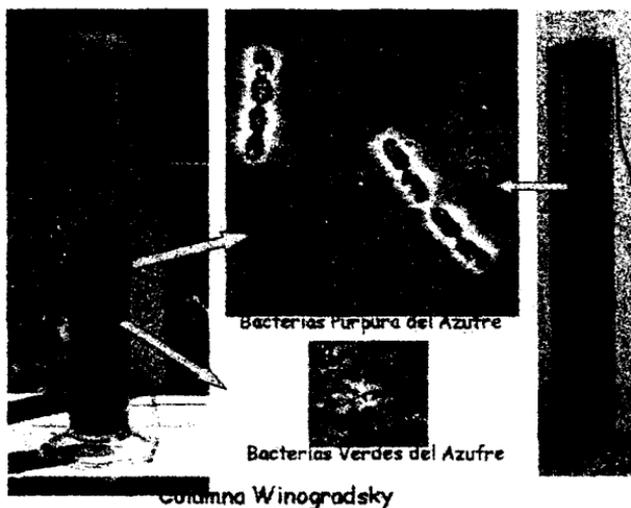
4. La Microbiología del siglo XX al XXI

Como hemos visto, la segunda mitad del siglo XIX fue una época de intenso desarrollo de la Microbiología, principalmente, aunque no sólo, centrado en el estudio de las principales enfermedades infecciosas. El siglo XX ha avanzado en muy variadas direcciones, comprendidas tanto en los aspectos básicos como en los aspectos aplicados del estudio de los microorganismos.

Si consideramos el aspecto de la biodiversidad, el siglo XX comienza con Martinus Beijerinck (1851-1931) y Sergei Winogradsky (1856-1953). A Beijerinck debemos los medios de enriquecimiento (lo que él denominaba cultivos selectivos), los primeros cultivos puros de muchos microorganismos del suelo y del agua: fijadores de N aerobios (*Azotobacter chroococcum*), reductores de sulfato, oxidantes de S, fijadoras simbióticas de N, etc. A Winogradsky debemos el aislamiento de microorganismos relacionados con los ciclos del N y el S (bacterias nitrificantes y sulfooxidantes), postulando el concepto de quimiolitotrofia. El siglo termina con la ampliación del mundo microbiano al nuevo dominio de las *Archaea* (Woese y Fox, 1977²⁰) y la toma de conciencia de que este dominio no está tan restringido en cuanto a su extensión como se creyó en un principio.

¹⁹ Trapero A. 1996. Los hongos fitopatógenos. En: Yácer G, López MM y A Bello. Patología Vegetal. Tomo II. pp 713-738. Sociedad Española de Fitopatología.

²⁰ Woese CR y GE Fox. 1977. Proc Natl Acad Sci U S A. 74(11): 5088-5090



4.1. Archaea, un dominio que crece

Efectivamente, en los últimos años del siglo XX los microbiólogos no especializados en el dominio *Archaea* habíamos llegado a la incorrecta idea de que este grupo de organismos eran todos extremófilos, reuniéndolos en los tres conocidos apartados de halófilos, metanógenos y termoacidófilos. Poco a poco hemos ido tomando conciencia de la extensión del dominio, presente en todo tipo de habitats, y de la falta de medios de que disponemos para su cultivo. Algo parecido nos pasó con *Bacteria*, cuando descubrimos que la mayor parte son microorganismos no cultivables y que tenemos que recurrir a la Biología Molecular para detectarlos.

Ahora podemos saber de la existencia de multitud de archaeas porque podemos encontrar sus rRNAs en el medio, aunque no las podamos cultivar. Estos rRNAs se pueden secuenciar, se pueden comparar con los que hay ya descritos y, de esa forma, colocar al microorganismo que posee tal rRNA en su posición correcta en el árbol filogenético del dominio.

En los próximos años nos iremos encontrando como las archaeas irán apareciendo en ambientes no extremófilos, incluyendo muestras clínicas, aprenderemos a cultivarlas y, consiguientemente, conoceremos más sobre la biología de este grupo microbiano.

4.2. La búsqueda de agentes antimicrobianos

Con el siglo XX también comienza la búsqueda de tratamientos para las enfermedades infecciosas, que sigue dos líneas paralelas con idéntico objetivo:

- El empleo de compuestos de síntesis que destruyan a los microorganismos de forma selectiva, sin que afecten a las células del paciente. Hay que destacar los primeros logros importantes de Paul Ehrlich, el salvarsán y el neosalvarsán, que le convirtieron en el padre de la quimioterapia. La continuación de esta línea la tenemos en el descubrimiento de las sulfamidas a partir del prontosil (Domagk, 1934 y Trefouel, 1935), el uso de las quinolonas desde los años cincuenta y los actuales compuestos antivirales y antiretrovirales.

LAS BALAS MÁGICAS DE PAUL EHRLICH

✓ colorantes

✓ atoxil

✓ arsacetina

✓ 606, salvarsán o "arsénico que salva"

✓ 914, neosalvarsán



- La búsqueda de compuestos de origen biológico, principalmente producidos por microorganismos, con toxicidad selectiva frente a los microorganismos patógenos. Todavía podemos seguir remarcando el descubrimiento de la penicilina (Fleming, 1929) como un hito que trasciende hasta nuestros días, ya que penicilinas siguen siendo los antibióticos de mayor uso a nivel mundial. Las nuevas penicilinas han sido mejoradas en tres aspectos problemáticos de las más primitivas: la ampliación del espectro, la farmacocinética y la resistencia a las betalactamasas bacterianas.



Desde el mismo momento en que se introducen los antibióticos en la terapéutica antimicrobiana, se empieza a detectar la aparición de cepas resistentes. La evolución no ha sido la misma para todos los antibióticos ni para todas las bacterias, siendo algunos casos particularmente preocupantes, como las cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA) o las de *Enterococcus faecalis* resistentes a vancomicina. Las consecuencias de la aparición de resistencias tampoco son idénticas para todos los antibióticos, sino que, en algunos casos, las resistencias desaparecen al cesar la presión selectiva del fármaco, mientras que en otras, las resistencias persisten en la naturaleza. Por ejemplo, las mutaciones en la *gyr A* que convierten a una bacteria resistente a quinolonas son mutaciones puntuales que no afectan a la actividad de la enzima que codifican. De esta forma, una vez alcanzada la resistencia, la cepa mutada no tiene por que ser desplazada por la cepa salvaje en ausencia de la presión selectiva del fármaco.

Entre los factores que promueven la emergencia de la resistencia destacamos:

- El uso de antibióticos que seleccionan mutaciones de resistencia, como las quinolonas, que seleccionan las cepas con mutaciones en *gyr A*, o las cefalosporinas que inducen la expresión de la betalactamasa Amp C, con alto

nivel de expresión constitutiva.

- La prescripción de antibióticos inadecuados o innecesarios, como el uso de antibióticos para tratamiento de infecciones de vías respiratorias, mayoritariamente de etiología vírica.
- Incumplimiento de tratamientos.
- Selección de microbiota comensal resistente.
- Posibilidad de obtener antibióticos sin receta y la consiguiente automedicación.
- El uso de antibióticos como promotores del crecimiento en el ganado.
- El empleo de antisépticos, desinfectantes o metales pesados en diferentes tratamientos. Los mecanismos de resistencia pueden ser cruzados con los de los antibióticos, como por ejemplo, las bombas de eflujo. En el caso de las sales de amonio cuaternario, la resistencia está situada en los genes *qac* que son parte fija de los integrones de clase I.

Mientras se trata de incidir con diversas medidas sobre estos y otros factores que promueven y facilitan la diseminación de las resistencias, la búsqueda de nuevos fármacos continúa. En este siglo que comienza, una vez superada por la práctica la separación entre antibióticos y agentes quimioterápicos de síntesis, llegaremos al diseño de los fármacos antimicrobianos, de forma que podamos dirigirlos específicamente al agente etiológico de la enfermedad en el foco infeccioso donde se encuentra.

Por un lado, se siguen buscando antibióticos por los métodos tradicionales, rastreando compuestos naturales; por otro, se están empleando las nuevas herramientas de que disponemos, la genómica, la proteómica y la bioinformática. Estas herramientas nos pueden proporcionar nuevas dianas diferentes de las ya conocidas, que nos permitirían emplear nuevos fármacos con la precisión de las *balas mágicas* que buscaba Ehrlich.

4.3. La búsqueda de nuevas vacunas

Como ya vimos, los orígenes de la inmunidad artificialmente adquirida se remontan a mucho antes de que se asociaran las enfermedades infecciosas a los microorganismos.

La *vacunación* de Edward Jenner (1749-1823) fue inmediatamente introducida en España por varios pioneros, entre los que destacan Francesc Piguillem, Pedro Hernández²¹, y el médico alicantino Francisco Xavier de Balmis, que fue Director de la llamada Expedición Filantrópica de la Vacuna²², que llevó la preciada *linfa* a los territorios de ultramar.

El uso de la vacuna frente a la viruela a nivel mundial a lo largo de estos dos últimos siglos, ha conducido, por vez primera en la historia de la humanidad, a la erradicación de una enfermedad infecciosa. En España, el último brote fue en Madrid, debido a dos personas que habían viajado a la India en 1961. De ellos, una niña fue hospitalizada, produciéndose posteriormente 17 casos, 12 de ellos contagiados en el hospital. La Jefatura Provincial de Sanidad hizo el estudio epidemiológico y procedió a la vacunación de, prácticamente, toda la población madrileña.

²¹ Balaguer E. y Ballester R. 2003. En el nombre de los niños. La Real Expedición Filantrópica de la Vacuna (1803-1806). Monografías de la Asociación Española de Pediatría, Madrid.

²² Díaz de Yraola G. 1948. La vuelta al mundo de la expedición de la vacuna. Escuela de Estudios Hispano-americanos, Sevilla.



D. Francisco Xavier de Balmis

Carlos IV autoriza la Expedición Filantrópica de la Vacuna

Tras oír los dictámenes del Consejo de Indias, del Consejo de Hacienda y de sus Médicos de Cámara, el 5 de agosto de 1803, Carlos IV decide que “se envíe una expedición marítima, compuesta de facultativos hábiles y adictos a la empresa, dirigida por el Médico honorario de Cámara D. Francisco Xavier de Balmis”.

“El precioso descubrimiento de la vacuna, acreditado en España y casi en toda Europa como un preservativo eficaz de las viruelas naturales, ha excitado la paternal solicitud del Rey a propagarlo en sus dominios de Indias, donde suele ser mayor el número de víctimas, que sacrifica esta horrorosa plaga. Con tal objeto se ha servido mandar, después de oído el dictamen del Consejo y de algunos sabios, que se forme una expedición marítima, compuesta de facultativos hábiles y adictos a la empresa, dirigida por el Médico honorario de Cámara D. Francisco Xavier de Balmis, y costeada de su Real erario; los cuales sin perdonar gastos, ni fatigas lleven suficiente número de niños a quienes inocular sucesivamente en el curso de la navegación; y conservando por este y otros medios el fluido vacuno en toda su eficacia, hagan a su arribo las primeras operaciones de brazo a brazo, las que continuarán después en ambas Américas, y si fuere dable en las islas Filipinas, observando las anomalías, que la diversidad de climas y de castas pueda producir, con el objeto de ilustrar cuanto se posible un descubrimiento en que tanto se interesa la humanidad, publicando oportunamente las observaciones y resultados de esta expedición filantrópica”.

¹ Gaceta de Madrid, 5 de agosto de 1803

La salida de la Expedición Filantrópica de la Vacuna

El miércoles 30 de noviembre de 1803, la María Pita zarpa cargada con su tripulación, los miembros de la expedición y el siguiente, e importantísimo, material:

- 500 ejemplares del "Tratado histórico y práctico de la Vacuna", de Jacques Louis Moreau de la Sarthe, traducido por Balmis en 1803, para irlos donando en las diferentes escalas.
- 4 termómetros.
- 4 barómetros para observaciones meteorológicas.
- 2000 laminillas de cristal para conservar la linfa vacunal, colocando una gota entre dos de ellas y cerradas herméticamente con parafina previo vacío.
- 1 máquina neumática para hacer el vacío en la preparación y conservación.
- 6 libros en blanco para ir escribiendo todas las incidencias.

La crónica de la época², fechada en La Coruña el 1 de diciembre de 1803 decía: *Ayer zarpó de este puerto la corbeta Maria Pita, al mando del Teniente de Fragata de la Real armada D. Pedro del Barco, llevando a su bordo los individuos de la expedición filantrópica destinada a propagar en América y Filipinas el precioso descubrimiento de la vacuna. No se ha omitido precaución alguna por parte del Ministerio, promovedor de una empresa tan importante como gloriosa, para que produzca pronta y seguramente todo el bien que desea el Rey y espera la humanidad. Son varios facultativos comisionados, y llevan 21 niños, que siendo sucesivamente inoculados brazo a brazo en el curso de la navegación, conservarán el fluido vacuno fresco y sin alteración. No por eso se han omitido otros medios de conducirlo, así para mayor seguridad, como para experimentar cuales son los que a largas distancias y en diferentes climas deben prefijarse. La expedición hará escala en Tenerife, Puerto Rico y la Habana para ofrecer por todas partes a los hombres el precioso descubrimiento de Jenner, así como lo ha hecho en los pueblos del tránsito desde Madrid, y en este puerto y en Santiago, mientras se equipaba la corbeta. De la Habana pasará a Veracruz, y de allí a otros puertos, en corbeta de los cuales se irán separando los facultativos, y ramificándose, por decirlo así, la expedición, hasta extenderse sobre todo el continente, fomentada por los Virreyes y Gobernadores ilustrados, sostenida por los facultativos despreocupados, auxiliada por los sabios, favorecida de los pueblos y generalmente protegida por los amigos de la especie humana. De la América se participarán los mismos beneficios a Filipinas, en donde no faltarán hombre ilustrados y generosos que procuren introducir la vacuna en otras islas y en la China. Así deberá la mitad del globo un don tan inestimable a la bondad liberal de nuestro Soberano, cuya generosidad se ha extendido a cuidar de la suerte de los niños de la expedición, y de los que en las escalas y en el continente los ha de ir sucesivamente reemplazando.*

² Gaceta de Madrid, 27 de diciembre de 1803

La última gran campaña mundial de vacunación lanzada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) se desarrolló en 1967. Tras esta campaña, se consiguió la erradicación de la viruela, sucediendo el último caso en octubre de 1977 en Somalia. Al año siguiente, aún se produjeron dos casos en Birmingham (Reino Unido), aunque no de viruela natural, sino que se trató de accidente de laboratorio. Finalmente, en 1980, después de 3 años sin que se declararan nuevos casos, la OMS consideró que la viruela estaba erradicada y recomendó que se dejaran de vacunar. Por tanto, la vacuna lleva sin usarse desde los años 80, salvo en los casos de personas que trabajan con *Orthopoxvirus*, sean de viruela humana u otros de origen animal (mixomatosis, vaccinia y monkeypox) y el personal vacunado tras las posibles amenazas bioterroristas desde 2002.

Años después de las inoculaciones experimentales introducidas por Jenner, fue Pasteur (1880) el primero que dio una explicación científica a la inmunización artificial cuando descubrió que el agente del cólera aviar envejecido quedaba atenuado en su virulencia y podía proporcionar inmunidad a las aves. Pasteur pensó que la pérdida de virulencia se debía al efecto del oxígeno²³. Al año siguiente, produjo una vacuna contra el carbunco en animales. Cuando presentó ese mismo año (1881) estos resultados en el Congreso Internacional de Medicina de Londres, propuso los términos de *vacuna* y *vacunación* en honor *al mérito y a los inmensos servicios de uno de los mayores hombres de Inglaterra, vuestro Jenner*. El siguiente logro importante de Pasteur en este campo sería la vacuna contra la rabia (1885), la única vacuna que aplicó a la especie humana.

A lo largo de los siguientes años, hasta la actualidad, la producción de vacunas ha seguido un camino irregular debido a múltiples circunstancias, entre la que podemos destacar:

- El descubrimiento y la introducción de los agentes quimioterápicos antimicrobianos hacía pensar que esa podía ser la vía adecuada para el combate de las enfermedades infecciosas.
- Como los microorganismos que responden a los tratamientos antibióticos son, mayoritariamente bacterias, la investigación en vacunas se centra, principalmente, en infecciones víricas.

La nueva toma de conciencia de la importancia de la vacunación ocurre en los años sesenta y setenta, cuando la OMS reconoce que la vacunación infantil, junto con la potabilización de aguas, son las medidas más eficaces frente a las enfermedades infecciosas. Desde el punto de vista cuantitativo, el impacto

²³ Senez JC. 1976. Microbiología General. 20-24. Editorial Alhambra.

sobre la reducción de la mortalidad infantil fue superior al de la introducción de los antibióticos en terapéutica. Es en esos años cuando se consigue la primera gran victoria de la erradicación de la viruela, reseñada mas arriba. Este puede ser el camino también para conseguir idéntico objetivo en otros casos, como el de la poliomielitis, posiblemente el siguiente objetivo a derrotar. En 1996, la OMS consiguió vacunar a 420 millones de personas frente a la polio, quedando los brotes limitados a algunos países africanos y asiáticos. A pesar de este probable próximo éxito frente a la polio, la ausencia de vacunas para enfermedades tan mortales como el SIDA, la malaria y otras parasitosis sigue siendo un reto pendiente para la sanidad del siglo XXI.

Las vacunas, además de incrementar la esperanza de vida y proporcionar una mejor salud de la población, reducen enormemente los costes sanitarios y sociales: tratamientos, hospitalizaciones, pérdidas de horas de trabajo... Estas son las causas por las que en los últimos años la investigación en vacunas está creciendo nuevos impulsos, y se están introduciendo en los calendarios de vacunación nuevos preparados, incluyendo antibacterianos, como las vacunas frente a *Haemophilus influenzae b* y *Streptococcus pneumoniae*.

Las técnicas que se están empleando en el desarrollo de nuevas vacunas son²⁴:

- Vacunas con vectores recombinantes.

Se trata de aislar genes de antígenos del patógeno e insertarlos en vectores víricos o bacterianos avirulentos. El microorganismo atenuado se reproduce en el huésped y expresa los productos génicos del patógeno en su superficie pudiendo inducir la respuesta inmunitaria celular y humoral. Los vectores que se están utilizando incluyen virus vaccinia, poliovirus atenuados, viruela de los canarios y cepas atenuadas de *Salmonella* y *Mycobacterium*. Algunos de estos vectores podrían ser portadores de antígenos procedentes de varios microorganismos patógenos, con lo que se conseguiría inmunidad frente a varias enfermedades.

- Vacunas de DNA.

Se trata de insertar, mediante un vector adecuado, los genes de los antígenos del patógeno. La expresión intracelular de estos genes pondría en marcha tanto la inmunidad humoral como la celular. Actualmente se intenta desarrollar este tipo de vacunación frente a malaria, SIDA, gripe, hepatitis B y herpesvirus, así como frente a algunos tipos de tumores, como linfomas, de próstata y de colon.

En España, el Laboratorio de Parasitología Molecular del Centro de

²⁴ Prescott LM, Harley JP y DA Klein. 2004. Microbiología, 5ª Edición. 826-27. McGraw Hill-Interamericana.

Investigaciones Biológicas ha conseguido importantes logros en la vacuna frente a la leishmaniasis combinando los dos procedimientos (Ramiro *et al.*, 2003²⁵). Así, las nuevas vacunas de DNA y de virus recombinantes serán mas baratas, mas fáciles de producir. Los plásmidos que se usan son inocuos para el paciente, estables, no requieren condiciones especiales de almacenamiento, lo cual es una gran ventaja debido a que en los países pobres es mas difícil el mantenimiento de los productos refrigerados o congelados. Además inducen una respuesta tanto humoral como celular duradera. En algunos casos especiales como por ejemplo en leishmaniasis, es necesario el incrementar la respuesta CD8+ por encima de la habitual (CD4+ y CD8+ *normal*). Para se usa una primera dosis de ADN en plásmido y una segunda con el gen metido en un virus recombinante (una cepa atenuada de vaccinia) que hace que la respuesta frente al antígeno protector sea más elevada. También se está probando la instilación nasal²⁶, con una magnífica respuesta en ratones y con una buena inducción de memoria.

En nuestros días existen mas vacunas que las que se consideran *obligatorias* en los calendarios de vacunación y son las autoridades sanitarias (en el caso de España, las autonómicas) las que deciden qué vacunas se incluyen o no. La aceptación de una vacuna puede depender de motivos puramente económicos cuando el producto es caro, como ocurre en el caso de *Haemophilus influenzae* y *Streptococcus pneumoniae*, pero no tiene porqué ser la única causa. Efectivamente, también podría ser estudiada la cobertura en términos de inconvenientes y molestias de la vacunación. Además, a medida que se introduzcan nuevas vacunas, supondrán más visitas al médico y más inyecciones. De ahí que uno de los objetivos que se están desarrollando en la actualidad es diseñar nuevas vacunas pediátricas combinadas enfocadas a cubrir las diferentes necesidades nacionales. Esto implica combinar varios antígenos en una misma jeringa, para minimizar el número de inyecciones.

Es posible que en los próximos años podamos ver el desarrollo de vacunas combinadas, no solo pediátricas, sino para uso general, dirigidas a la prevención de enfermedades del viajero y diseñadas específicamente para cada área geográfica.

Es curioso, que comenzamos hablando de la historia de la inmunización artificial

²⁵ Ramiro MJ, Zarate JJ, Hanke T, Rodriguez D, Rodriguez JR, Esteban M, Lucientes J, Castillo JA and V Larraga. 2003. Protection in dogs against visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* is achieved by immunization with a heterologous prime-boost regime using DNA and vaccinia recombinant vectors expressing LACK. *Vaccine*. 21(19-20):2474-84.

²⁶ Fonseca Pinto,E.; Olmo Pinheiro,R.; RayoLA.;Larraga,V. Rossi-Bergman,B. 2004. Intradermal vaccination against cutaneous leishmaniasis using a particulated leishmanial antigen and LACK-DNA. *Infection and Immunity*. 72:4521-27

tratando de poxvirus (el virus vaccinia acaba con la viruela en el mundo) y de nuevo, en el siglo XXI, estos virus son los mas firmes candidatos a ser portadores de antígenos múltiples.

4.4. La guerra biológica y el bioterrorismo

También se ha hablado de poxvirus en los últimos tres años porque, debido a la amenaza de un posible ataque bioterrorista, hubo que descongelar las últimas reservas que quedaban de vacunas de la viruela e incluso volver a reiniciar la producción.

El hecho de que hayamos vuelto a retomar el estudio de la viruela, una vez erradicada, se debe a que es uno de los principales agentes biológicos que puede ser empleado en la Guerra Biológica y el Bioterrorismo. Los virus de la viruela están incluidos en la Categoría A de los CDC.

La alarma en España se disparó a principios de 2003, cuando los titulares de prensa decían: *“España compra dos millones de vacunas para prevenir un ataque con viruela. EE UU sostiene que Irak tiene medios para contagiar una enfermedad erradicada en 1980”*. Efectivamente, las noticias decían que Gobierno español había adquirido dos millones de vacunas de viruela para hacer frente a un ataque bioterrorista con ese virus infeccioso. La compra la habrían realizado conjuntamente los ministerios de Sanidad y Defensa a una multinacional y el coste de la operación ascendería a unos 7,2 millones de euros. Mientras, el secretario de Estado de EE UU, Colin Powell, decía ante el Consejo de Seguridad de la ONU que Irak tenía medios para desarrollar la viruela. En algunos laboratorios españoles, relacionados con la Microbiología, ya se sabía, hacía mas de un año, que esto podría ocurrir, y se habían detectado movimientos en ese sentido. Además, por entonces ya se había producido, a raíz del 11 de septiembre de 2001, un ataque con armas biológicas en los EEUU, el conocido episodio de las cartas conteniendo esporas de *Bacillus anthracis*, la bacteria que produce el carbunco, denominado ántrax por los norteamericanos. El ataque se saldó con 16 casos, confirmados por los CDC (Centres for Disease Control and Prevention), 6 posibles y 4 fallecimientos.

Los microorganismos como Armas Biológicas

Cualquier agente etiológico de cualquier enfermedad infecciosa, por grave que sea, no tiene porqué servir para ser usado como arma. Las características que debe tener un microorganismo para ser usado como Arma Biológica son:

- Ser muy letal o altamente incapacitante
- Con pocos problemas de producción
- Fácil de introducir en armas
- Difícil de detectar, al menos en los primeros momentos
- Con gran impacto en la salud pública, causando pánico y alarma social

De acuerdo con los CDC, los agentes de guerra biológica pueden ser clasificados en tres categorías:

- Categoría A: Fácilmente diseminados o transmitidos de persona a persona, con altas tasas de mortandad, con gran impacto en la salud pública, causantes de pánico y alarma social, y que requieren preparación especial de la Salud Pública. *Bacillus anthracis*, toxina de *Clostridium botulinum*, *Yersinia pestis*, virus de la viruela, *Francisella tularensis*, filovirus (Ebola, Marburg) y arenavirus (Lassa, Machupo).
- Categoría B: Moderadamente fáciles de diseminar, con moderada morbilidad y bajas tasas de mortandad, que requieren incrementos específicos de la capacidad de los centros de diagnóstico e incremento de la vigilancia. *Brucella* spp., toxina de *Clostridium perfringens*, *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157:H7, *Shigella*, *Burkholderia mallei* (muermo), *Burkholderia pseudomallei* (melioidosis), *Chlamydia psittaci* (Psittacosis), *Coxiella burnetii* (fiebre Q), *Rickettsia prowazekii* (tifus), enterotoxina B de *Staphylococcus aureus*, encefalitis víricas por alfavirus (encefalitis equina Venezolana, encefalitis equina del Este encefalitis equina del oeste), *Vibrio cholerae*, *Cryptosporidium parvum*, ricina *Ricinus communis*.
- Categoría C: Se trata de patógenos emergentes que pueden ser manipulados para diseminación en masa en el futuro, debido a su disponibilidad, facilidad de producción y diseminación, así como potenciales tasas elevadas de morbilidad y mortandad. Enfermedades infecciosas emergentes como el virus Nipah y los hantavirus.

De acuerdo con el Comité Internacional de Taxonomía de Virus²⁷, el virus de la viruela pertenece a la familia *Poxviridae*, la subfamilia *Chordopoxvirinae* y el género *Orthopoxvirus*. Entre los virus de esta familia se encuentran el virus de la viruela vacuna, el virus vaccinia (empleado en la vacuna), el virus de la mixomatosis del conejo, el de la viruela de los monos, etc... Estos virus, particularmente el virus vaccinia, han contribuido enormemente al desarrollo de conocimientos generales sobre las enfermedades infecciosas y la inmunidad. Además, el virus vaccinia fue el primer virus animal visto microscópicamente, cultivado en cultivo de tejidos, titulado con precisión, purificado físicamente y analizado químicamente²⁸.

La investigación sobre los poxvirus no terminó cuando se llegó a la erradicación de la viruela. La tecnología de DNA recombinante, que evita el trabajo con la gran partícula vírica completa, ha conducido a importantes progresos en la comprensión de la replicación del virus. Además, como vimos en el apartado anterior, el virus vaccinia ha sido desarrollado como vector vivo de recombinación, con lo que ha proporcionado un nuevo instrumento para la expresión de genes, para la producción de vacunas frente a una variedad de agentes de enfermedades infecciosas o, como no podía ser menos, para el mal, para su uso como Arma Biológica.

El virus de la viruela ha sido siempre un candidato a ser usado en la guerra biológica o en un ataque bioterrorista por varias razones. Se adapta, al menos en parte, a las características ideales que debe tener un microorganismo para ser usado como Arma Biológica:

- Ser muy letal o altamente incapacitante: Como ya hemos visto, la mortandad se puede elevar hasta el 30% o más, y los efectos secundarios pueden ser muy graves (cicatrices desfigurantes que pueden afectar a la cara y las cicatrices en la cornea que pueden producir ceguera).
- Pocos problemas de producción: Aunque los virus no son tan fáciles de producir como las bacterias, en este caso concreto, se trata de un microorganismo que sí se ha producido en grandes cantidades. Que sepamos, según Ken Alibek²⁹ fue producido por la antigua Unión Soviética, llegándose a almacenar 20 toneladas en Zagorsk, en su arsenal de armas biológicas de los años setenta, y hacia 1990

²⁷ van Regenmortel M.H.V. 2000. The Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Press

²⁸ Moss B. 1996. *Poxviridae*: The viruses and their replication. En: Fields B.N. Editor. Fields Virology. 3rd Edition. pp 2637-2671. Lippincott-Raven Publishers.

²⁹ Alibek K, Handleman S. 1999. *Biohazard: The chilling true story of the Largest Covert Biological Weapon Program in the World. Told from the inside by the man who ran it.* Random House, New York. Pag. 261-264.

disponía de una planta capaz de producir de 80 a 100 toneladas anuales de virus. Entonces, no estaríamos hablando de que un grupo bioterrorista dispusiera de los medios para la producción, sino que hubiera podido acceder a una parte de las reservas ya producidas.

- Fácil de introducir en armas: el virus se transmite por vía aérea, siendo muy estable en aerosol y, teniendo en cuenta que la dosis infecciosa es relativamente baja, puede generar brotes cuantitativamente importantes. Efectivamente, los virus de la viruela, como los vaccinia, son relativamente estables, resistiendo la desecación y manteniendo su infectividad durante muchos meses a 4°C y por años en congelación de -20° a -70°C.

- Difícil de detectar: el gran número de días que transcurren hasta la aparición de los síntomas claros de que se trata de viruela hacen que, efectivamente, se tarde en dar la alarma de ataque bioterrorista. Además, debido a la gran movilidad actual de las personas, cuando aparecen casos geográficamente distantes, es difícil dilucidar, en principio, si se trata de contagiados de víctimas de un ataque anterior o, por el contrario, se trata de nuevos ataques.

4.5. La percepción de quorum

Desde el momento en que se descubren los microorganismos y se empieza a profundizar sobre el comportamiento bacteriano, los investigadores pensaban que las bacterias no tenían forma de comunicarse, que se comportaban como conjuntos de individuos que crecían de forma independiente entre sí. En los últimos años hemos venido observando que muchas bacterias son capaces de tener un tipo de comunicación entre sí, controlando la densidad de la propia población, y funcionar de forma cooperativa en algunos casos. El fenómeno, que originalmente se designó *autoinduction*³⁰, fue descrito en 1966 por J. W. Hastings y sus colaboradores, que estudiaban la bacteria luminiscente *Vibrio fischeri*. Trabajando con cultivos bacterianos, Hastings comprobó que sólo se hallaban grandes cantidades de luciferasa cuando el cultivo de *V. fischeri* se encontraba en un punto ya avanzado de la fase logarítmica. Posteriormente se descubrió que se trataba de una manera muy primitiva de comunicación entre las bacterias que permite optimizar la producción de determinados metabolitos, evitando que se desperdicien en el medio. Luego se dio en llamar *quorum sensing*³¹,

³⁰ Greenberg EP. 1997. Quorum sensing in Gram-negative bacteria. *ASM News*. 63: 371-377.

³¹ Fuqua WC, Winans SC and EP Greenberg. 1994. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *Journal of Bacteriology*. 176: 269-275.

denominación que se ha cuestionado en nuestro idioma, proponiéndose otras como percepción de quorum³².

Las bacterias determinan su propia densidad de población a través de la liberación de unas moléculas sensoras. Pero no se trata de un único *idioma*, ya que se conocen varias clases de moléculas señalizadoras y el mensaje emitido por una bacteria puede no ser captado por otra, si ésta no dispone del mecanismo de reconocimiento adecuado. La concentración se incrementa según lo hace la población hasta que se alcanza un nivel crítico (el quorum). En ese momento, las bacterias expresan los genes dependientes del quorum.

La percepción de quorum tiene un significado eminentemente práctico para la economía bacteriana. Por ejemplo, en la producción y liberación de enzimas sería muy poco práctico que unas pocas bacterias liberaran una pequeña cantidad de enzima, porque se difundiría y se diluiría rápidamente, de forma que esta liberación sería ineficaz. Por el contrario, si la producción ocurre al alcanzar el quorum, la enzima se liberaría a la concentración adecuada.

La percepción de quorum existe tanto en Gram-positivas como en Gram-negativas. Es en estas últimas en las que mejor se conoce el mecanismo, consistente en la liberación de una acil-homoserina-lactona (como la N- β -cetocaprilhomoserina lactona de *Vibrio fischeri*), que se difunde al interior de la célula diana. Cuando estas moléculas alcanzan un nivel suficiente se unen a unas proteínas receptoras en las que inducen un cambio de conformación. Estos complejos actúan como inductores, se unen a sitios diana en el DNA y estimulan la transcripción de genes dependientes del quorum. Los genes necesarios para la síntesis de las acil-homoserina-lactonas también se suelen inducir, por lo que se amplifica el efecto. En Gram-positivas, la regulación la ejerce, normalmente, un oligopéptido.

Algunos de los procesos mejor conocidos en los que hay participación de percepción de quorum son, entre otros:

- La producción de luz en *Vibrio fischeri*.
- La síntesis y liberación de factores de virulencia en *Pseudomonas aeruginosa*.
- La conjugación en *Enterococcus faecalis*.
- La inducción del estado de competencia en *Streptococcus pneumoniae*.

³² GuerreroR y M Piqueras. 2003. La evolución del lenguaje científico. I. De la fotosíntesis a la percepción de quórum. *Actualidad SEM*. 36:24-25

- La estimulación de la esporulación en *Bacillus subtilis*.
- La producción de numerosas toxinas y factores de virulencia en *Staphylococcus aureus*.

El conocimiento de los mecanismos moleculares de este fenómeno abre nuevas puertas a la terapéutica de muchas infecciones, que quizás puedan resolverse algún día sin acudir a los antibióticos, los cuales, por otra parte, no siempre son eficaces. En algunos tipos de infecciones, como las causadas por *Pseudomonas aeruginosa* en personas afectadas por la fibrosis quística, los antibióticos no logran penetrar hasta las capas más internas de la masa de bacterias debido a la formación de biofilms. En estas circunstancias, dos diferentes bacterias, *Pseudomonas aeruginosa* y *Burkholderia cepacia*, pueden estimularse mutuamente mediante la liberación de señales.

Como vemos, la percepción de quorum debe estar bastante extendida en muchos fenómenos de la actividad microbiana. De ahí la importancia de que en un futuro próximo logremos comprenderlo bien, de forma que podamos controlar muchas de estas actividades, como por ejemplo, el momento en que, una vez alcanzado el quorum, el microorganismo patógeno desarrolla la enfermedad. También podríamos controlar la resistencia bacteriana a los antibióticos, por ejemplo, estudiando las condiciones de producción de un enzima inactivante.

4.6. La evolución de la genómica y la proteómica

La palabra genómica es relativamente reciente, data de los años ochenta y fue creada para describir el estudio del mapeo, la secuenciación y el análisis de los genomas.

Podíamos situar la prehistoria de la genómica bacteriana el 1928, cuando Frederick Griffith descubre la transformación bacteriana, aunque hasta 1944 no se llega a explicar el fenómeno por parte de Avery, Macleod y McCarthy: el DNA es el material genético, el agente transformante. Es a partir de esa segunda mitad de los años cuarenta, cuando los científicos van desarrollando técnicas para estudiar los genes microbianos. Los estudios comprendían los mapeos, así como la función y la regulación de los genes.

Los avances más importantes en este tema fueron:

- Descubrimiento de la conjugación bacteriana: E. Tatum y J. Lederberg, 1946.

- Descubrimiento de la transducción: J. Lederberg y N. Zinder, 1952.
- Publicación de la estructura del DNA: J. Watson y F. Crick, 1952.
- El concepto de operón: F. Jacob, D. Perrin, C. Sánchez y J. Monod, 1960.
- Desciframiento del código genético: M. Nirenberg y H. G. Khorana, 1966.
- Especificidad de las nucleasas de restricción: H. Smith, 1970.
- Técnicas del DNA recombinante: S. Cohen, A. Chang, R. Helling y H. Boyer, 1973.
- Secuenciación del DNA: F. Sanger, S. Niklen y A. Coulson, 1977.
- Técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR): K. Mullis, 1988.
- Secuencia completa de un genoma bacteriano (*Haemophilus influenzae* Rd): Fleischmann RD, Adams MD, White O, Clayton RA, Kirkness EF, Kerlavage AR, Bult CJ, Tomb JF, Dougherty BA, Merrick JM, et al., 1995.

Actualmente ya se tiene la secuencia completa de 387 bacterias, 29 arqueas, 44 eucariotas y hay 2.208 proyectos de secuenciación³³, a lo que habría que añadir las miles de secuencias parciales depositadas en el Gene Bank.

Una vez conocida la secuencia completa comienza el trabajo de localizar los genes. Hay que localizar los marcos de lectura abiertos (ORF, open reading frame), no interrumpidos por un codón de terminación, de más de cien codones que, en potencia, podría ser una secuencia codificadora de proteínas. Ahí es donde se utiliza una potente herramienta, sin la cual sería imposible realizar este trabajo: la bioinformática. Un programa informático compara la secuencia del ORF con secuencias existentes en las bases de datos: si la secuencia coincide con alguna de las depositadas, se supone que codifica la misma proteína. Este proceso de comparación puede asignar una función, provisionalmente, a cerca del 50% de las supuestas regiones codificadoras.

La comparación de las secuencias de diferentes bacterias contribuirá de forma significativa a la comprensión de la evolución, la relación de los genes con los diversos procesos microbianos y facilitará nuestro conocimiento de la regulación genética y la organización del genoma.

Las relativamente pocas secuencias completas publicadas actualmente ya nos

³³ Liolios K, Tavernarakis N, Hugenholtz P, Kyrpides. NC. The Genomes On Line Database (GOLD) v.2: a monitor of genome projects worldwide. En URL: <http://www.genomesonline.org/>

están aportando nuevos e importantes conocimientos. Uno de estos casos es *Mycoplasma genitalium*, con un genoma de tan solo 580 kb, uno de los más pequeños de vida libre. Su secuencia nos ha servido para establecer cuál es el juego de mínimo de genes necesario para mantener una existencia de vida libre. Comparando con el genoma de *Mycoplasma pneumoniae*, se encuentra que unos 70 genes de *Mycoplasma genitalium* pueden no ser necesarios para la supervivencia, puesto que han sido inactivados por inserción de transposones y se ha demostrado que no lo eran³⁴. De la comparación de los genomas completos de las especies bacterianas *M. genitalium* (580.070 pb) y de *Hemophilus influenzae* (1.830.137 pb) y aceptando la hipótesis de que los genes conservados en la evolución de ambas especies son los esenciales, se necesitaría la existencia de un juego mínimo de 256 genes fundamentales³⁵.

Como vemos, los avances que se han conseguido en el conocimiento del genoma en el apenas medio siglo transcurrido desde el descubrimiento de al doble hélice, son muy grandes, sobre todo en los últimos diez años. Estamos conociendo una gran cantidad de secuencias aunque, en la mayor parte de los casos, desconocemos la funcionalidad de las proteínas codificadas por esos genes secuenciados. Por tanto, el siguiente paso es llegar al conocimiento de la función de los genes. Las herramientas que nos van a llevar a cumplir este objetivo, el análisis de la expresión génica, son, básicamente, dos:

- La genómica funcional, los microarrays de DNA, que nos informa sobre la expresión de genes a nivel de ácidos nucleicos.
- La proteómica, que analiza la expresión genética a nivel de proteínas.

Las técnicas de los microarrays de genes ofrecen el potencial de analizar todos los genes de un organismo en un momento concreto. La técnica consiste en desecar la muestra, que contiene las secuencias a analizar (genes clonados amplificados mediante PCR y purificados), en un porta, donde se deseca. Las muestras se colocan sobre el soporte según un patrón bidimensional guiado por un sistema robótico. Para estudiar la expresión génica, los RNAs de los cultivos control y de los cultivos problema se convierten en cDNA (microarrays de DNA) mediante la transcriptasa inversa³⁶. También se pueden utilizar oligonucleótidos, de unos 25

³⁴ Hutchison CA, Peterson SN, Gill SR, Cline RT, White O, Fraser CM, Smith HO, Venter JC. 1999. Global transposon mutagenesis and a minimal *Mycoplasma* genome. *Science*. 286(5447):2165-9.

³⁵ Fraser CM, Gocayne JD, White O, Adams MD, Clayton RA, Fleischmann RD, Bult CJ, Kerlavage AR, Sutton G, Kelley JM, et al. 1995. The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium*. *Science*. 270(5235):397-403.

³⁶ Shena M, Shalon D, Davis RW and PO Brown. 1995. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*. 270: 467-470

nucleótidos, que son sintetizados directamente en la superficie (GeneChips®)³⁷. El nuevo cDNA se marca con dos diferentes fluorocromos. La mezcla marcada se hibrida con las muestras en el microarray y se emplea un scáner para medir la fluorescencia emitida. La emisión de fluorescencia por la muestra problema se cuantifica y se compara con la respuesta obtenida de los cultivos control. La sensibilidad de la técnica es enormemente superior a las técnicas tradicionales de hibridación sobre membrana puesto que permite detectar una molécula de RNA concreto entre 100.000.

Aparte de los microarrays personalizados que se puedan hacer para casos concretos, existen numerosos microarrays comerciales que contienen 6400 marcos de lectura abiertos (ORF) para el estudio de la expresión génica en *Saccharomyces cerevisiae*, y otros con 4200 ORFs para *E. coli*. Ello nos da idea de lo que el futuro próximo nos va a proporcionar: una cantidad inmensa de datos sobre la expresión genética de organismos enteros en diversos momentos funcionales, con unas aplicaciones que crecerán a medida que vayamos avanzando en ese propósito.

El proteoma es el conjunto de proteínas de un genoma, una célula o un tejido. La proteómica es el estudio a gran escala de los productos génicos de un genoma mediante métodos bioquímicos, con el fin de obtener una visión global e integrada de los procesos celulares³⁸. La aplicación de la proteómica tiene un enorme potencial en el área de la biomedicina para el desarrollo de fármacos (anticancerígenos, para el sistema nervioso, aparato cardiovascular, antimicrobianos, etc) métodos de diagnóstico, desarrollo de vacunas, etc. La proteómica se puede abordar desde varios puntos de vista:

- La proteómica de expresión, que estudia cuantitativamente la expresión de proteínas entre muestras que se diferencian en alguna variable.
- La proteómica de mapa celular o estructural, que estudia la localización subcelular de las proteínas y las interacciones proteína-proteína.
- La proteómica funcional, que permite el estudio y caracterización de un grupo concreto de proteínas, proporcionando importante información sobre su función.

Las herramientas de la proteómica son muy variadas puesto que el estudio de

³⁷ Fodor SP, Read JL, Pirrung MC, Stryer L, Lu AT and D Solas. 1991. Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis. *Science*. 251: 767-773

³⁸ Gil García C. 2002. La metodología proteómica, una herramienta para la búsqueda de función. *Actualidad SEM*. 35: 12-20.

las proteínas se lleva a cabo de forma multidisciplinar. Entre estas herramientas destacamos:

- Electroforesis bidimensional de proteínas en gel de poliacrilamida (2D-PAGE), que separa las proteínas, primero por su carga (mediante isoelectroenfoque) y, en segundo lugar, por su masa molecular.
- Espectrometría de masas, con sus variantes: MALDI (ionización desorción con laser asistida con matriz), TOF (time of flight), ESI (ionización mediante electrospray)...

Como toda la tecnología, la infraestructura y el personal especializado necesario para los estudios genómicos y proteómicos no están al alcance de un grupo de investigación normal, la situación lógica es la que se está desarrollando en nuestro entorno: la creación de Servicios de Apoyo a la Investigación (SAIs). De esta forma se optimiza el rendimiento de los grupos, facilitándoles la labor y haciendo que los resultados sean mas fiables, puesto que los ha obtenido personal especializado en cada técnica. Los microbiólogos tendremos acceso a una cantidad inmensa de información presente en las múltiples bases de datos, tanto de genómica como de proteómica (Gene Bank, Yeast Protein Database...), que nos servirá para comparar nuestros resultados usando las potentes herramientas que nos proporciona la bioinformática. De esta forma, los avances, que en el anterior siglo contábamos por décadas, veremos como se van produciendo de forma continua.

Quede claro que el hecho de que se hayan desarrollado estas potentes herramientas, no significa que haya que anular las técnicas tradicionales de cultivo de microorganismos y que debamos despreciarlas por antiguas. En todo caso, las técnicas moleculares y las tradicionales pueden y deben coexistir y habrá que aplicar la adecuada en cada caso.

5. La contribución de los microbios a la Biología

El título de este último apartado coincide con el que dieron hace cincuenta años dos de los grandes microbiólogos del siglo XX, Albert J. Kluyver y Cornelius B. van Niel, a una obra de enorme trascendencia en la investigación biológica³⁹. En ella ya calculaban, y se quedaban cortos, que *“la masa total de protoplasma microbiano supera con mucho al protoplasma animal. Ignorar el mundo microbiano implica obviamente no tener en cuenta a una parte importante, quizá la mitad, del protoplasma viviente de la Tierra”*. Desde entonces sabemos y debemos transmitir a la sociedad que los microorganismos son componentes mayoritarios de la biosfera y que solo una pequeña minoría, despreciable desde el punto de vista cuantitativo, se ha adaptado al parasitismo y son los agentes de enfermedades infecciosas.



Kluyver, A.J. and C.B. van Niel, 1956. *The Microbe's Contribution to Biology*. Harvard University Press, Cambridge, MA.

Pero la contribución de los microbios, como dice el título, no es solamente cuantitativa, sino que ya por aquella época se constata que los microorganismos nos ofrecen los principales modelos para estudiar los conceptos básicos de la Biología y los procesos biológicos fundamentales, que son comunes a todas las formas de vida. Se mostró al mundo científico la excepcional capacidad metabólica de los microorganismos para adaptarse rápidamente a los más variados ambientes. Esta rápida capacidad de adaptación está estrechamente

³⁹ Kluyver, A.J. and C.B. van Niel, 1956. *The Microbe's Contribution to Biology*. Harvard University Press, Cambridge, MA.

relacionada con la gran plasticidad genética, la posibilidad de añadir la transferencia horizontal de genes a la transferencia vertical de generación en generación.

Los cincuenta años transcurridos desde la publicación de *The Microbe's Contribution to Biology* no han hecho sino confirmar y ampliar nuestras perspectivas con el estudio de los microorganismos, no solo como especies individuales o poblaciones de una especie, sino que nos ha llevado a la comprensión de estos seres vivos como la base del funcionamiento de la biosfera. En muchos ecosistemas microbianos, la unidad de funcionamiento está constituida por diversas poblaciones microbianas que interactúan entre sí y con otros seres vivos, de forma que las alteraciones que se produzcan en estas cadenas pueden tener una gran importancia ambiental.

Si antiguamente los *cazadores de microbios* se limitaban, prácticamente, a la búsqueda de aquellos microorganismos que causaban enfermedades infecciosas, hoy día tenemos que salir a buscarlos en todo tipo de ecosistemas. Digo tenemos, aunque quizás debería decir tendríamos, porque la búsqueda de nuevas cepas y especies microbianas a partir de la naturaleza, rara vez consigue una financiación adecuada ya que se trata de investigación básica con pocos beneficios a corto plazo. Los beneficios a medio y largo plazo solo tienen que esperar a que alguien descubra la importancia de alguna característica de ese nuevo microorganismo descubierto. Cuando Freeze y Brock⁴⁰ descubrieron *Thermus aquaticus* en las aguas termales de Yellowstone en 1969, no se podían imaginar que una enzima de su bacteria (la Taq polimerasa) alcanzaría el desarrollo comercial que ha alcanzado desde que K. Mullis introdujo la PCR como técnica, ahora ya básica, en el estudio de ácidos nucleicos.

Con esa conciencia global, en esta Facultad, incluso desde antes de su existencia, cuando este Campus fue Colegio Universitario adscrito a la Universidad Complutense, hemos defendido el hecho de que la Microbiología, y otras ciencias, podían ser *de bata, de bata* o de ambas modalidades. Nosotros optamos por la modalidad mixta (en alguna ocasión fui acusado de naturalista), unidos por dos lemas que, afortunadamente, algunos aún conservamos y tratamos de transmitir:

- Fascinación por el saber, con independencia de factores de impacto.
- Pasión por la docencia, antes y durante Bolonia.

⁴⁰ Freeze H. and T.D. Brock. 1969. *Thermus aquaticus* gen. n. and sp. n., a Nonsporulating Extreme Thermophile. *J Bacteriol.* 98 (1): 289-297.

Aplicando estos dos lemas hemos chocado con la mentalidad de los que solo vienen a la Universidad a que les otorgue un título que les faculte para ejercer una profesión, contando hacia atrás, cual preso cuenta los días que le quedan para la libertad, los créditos que le quedan para conseguir su objetivo. A estos hay que transmitirles que, si importante para ellos es el objetivo, no lo es menos el trayecto a recorrer que es la estancia en la Universidad. Es este trayecto irrepetible, se van a encontrar muchas interesantes paradas, por un lado llenas de relaciones personales y, por otro, oportunidades de disfrutar del aprendizaje durante el infinito viaje del conocimiento.

No quiero terminar sin reivindicar la leyenda de la Universidad, hoy casi desaparecida de nuestros documentos, cuando más se la necesita, ya que nos toca vivir unos tiempos en los que la machacona mentira, a fuerza de repetirse, se va abriendo paso y se asienta en la sociedad. Yo, a modo de objetor de conciencia, cuando ya apenas se hace visible entre nosotros, la sigo empleando en mis presentaciones y en ésta no iba a ser menos, por tanto termino con un

in veritate libertas

Muchas gracias