

Temas de actualidad

La simbiosis como mecanismo de evolución

Ricardo Guerrero

Departamento de Microbiología, Universidad de Barcelona, Avda. Diagonal 645, 08028 Barcelona.
E-mail: guerrero@retemail.es

Cierto que la ciencia, rebelándose, al parecer contra el destino, ha inventado el microscopio, con la mira de sorprender tan minúsculos enemigos (y esto representa ya un fruto intelectual del microbio). Mal haríais, sin embargo, en vanagloriaros de tan grosero instrumento. Juguete harto imperfecto todavía, a su incapacidad resolutiva escapan millones de vidas infinitesimales, ultramicroscópicas: las bacterias de las bacterias; el impalpable polvo de miríadas vitales disperso en el aire, el agua y las tierras; las imperceptibles colonias intracelulares, especie de federaciones simbióticas, que ahora solamente comienzan a alborear, a título de arriesgadísimas conjeturas, en la mente de algunos sabios audaces. Algún día os será lícito quizá rastrear la morfología y costumbres de tan diminutas y ultramicroscópicas organizaciones confinantes con la nada y muy distantes aún de las más groseras construcciones moleculares. Mas para ello os será fuerza abandonar los sencillos principios de la óptica amplificante fundados sobre el fenómeno banal de la refracción de las ondas luminosas visibles (oscilaciones bastas sobre las cuales sólo ejercen influencia partículaplástico superiores a unas décimas de micra), y recurrir a radiaciones invisibles, infinitamente delicadas y todavía ignotas, de la materia imponderable. Y así y todo, la ciencia no podrá agotar los dominios de la vida. Lo invisible, infinitamente más importante que lo visible, os envolverá siempre, y cada edad tendrá sus enemigos inaccesibles, porque el alazán del progreso sólo galopa espoleado por el calcañar de la muerte.

Quien esté familiarizado con la obra de los naturalistas rusos del último tercio del siglo XIX, al leer este párrafo podría pensar que tiene en sus manos la traducción (muy elegante, por cierto) de algún texto de autores como Konstantin Sergeevich Merezhkovsky (1855-1921), Andrei Sergeevich Famintsyn (1835-1918), o Boris Mijaylovich Kozo-Polyansky (1890-1957). Sin embargo, no es necesario ir tan lejos. El texto se debe a nuestro Santiago Ramón y Cajal (1852-1934), y se encuentra en *El pesimista corregido*, uno de sus *Cuentos de vacaciones* [1]. Cajal escribió el libro en 1885, pero lo publicó 20 años más

tarde, y demuestra las aptitudes de Cajal para la ciencia ficción. El subtítulo de la obra es *Narraciones seudocientíficas*, e inicialmente tenía doce relatos, pero finalmente solamente publicó cinco: *A secreto agravio, secreta venganza, El fabricante de honradez, La casa maldita, El pesimista corregido, y El hombre natural y el hombre artificial*. Algunos de estos cuentos reflejan la fascinación de Cajal por los microorganismos y por la manera que tiene el cuerpo de luchar contra la invasión microbiana. De *Cuentos de vacaciones* se han hecho varias ediciones (por ejemplo, en la Colección Austral de Espasa Calpe) y recientemente se ha traducido al inglés (por Laura Otis, University of Illinois Press, 2001 [2]).

Siendo estudiante de medicina, Cajal escribió una novela "biológica" –así la definió él– que mostraba el cuerpo humano desde la perspectiva microbiana y como un campo de batalla entre los leucocitos y las células invasoras. Desgraciadamente, estas primeras obras, inéditas, se han perdido.

La idea de la existencia de la simbiosis, y de su papel en la evolución, no es nueva en biología. No obstante, hasta hace muy poco correspondía más bien al sector que podríamos calificar de heterodoxo, y a autores que no eran especialmente bien vistos por el núcleo central, "autorizado" y "autorizador", del pensamiento biológico moderno.

La madre naturaleza nunca se ha acomodado, y probablemente nunca vaya a hacerlo, a los deseos de dominio con que nuestra especie ha intentado doblegarla. La naturaleza es demasiado "salvaje", o demasiado "anárquica", dependiendo del trasfondo ideológico con el que se la contemple. Pero hay un dicho castellano que indica que, bien al contrario, "es muy sabia". Los gemelos idénticos, con una dotación genética semejante, nunca son absolutamente idénticos en sus manifestaciones. Por ejemplo, sus conexiones neuronales difieren tanto entre ellos como puedan diferir las de dos personas sin ningún vínculo genético. La identidad absoluta es una fantasía platónica, como lo es el absoluto control biológico. El mundo real está marcado por diferencias, ambigüedades,

impurezas, mezclas y experiencias. Los genes pueden fluir entre microorganismos en un parpadeo del tiempo geológico. La segunda ley de la termodinámica muestra una tendencia probabilística a mezclar diferencias, a romper gradientes. La naturaleza odia el vacío. Todo microbiólogo sabe del esfuerzo que cuesta mantener axénicamente una cepa bacteriana durante un período de tiempo prolongado. El mundo tangible no favorece la pureza genética. La naturaleza, impredecible y alevosa para algunos, juega ora dispersando, ora reuniendo, conjuntos variopintos de múltiples elementos.

Genes, DNA, de indiscutible origen procariótico se hallan en plantas, animales y hongos. Nuestra identidad genética se ramifica continuamente por efecto de genes bacterianos o víricos extraños, o incluso por bacterias y virus que no son patógenos invasores, sino que se integran constante y necesariamente en lo que creemos es nuestro yo más puro.

Cuando se habla de modificación genética –"manipulación" para sus detractores–, de biotecnología, se proyecta un halo de oscuridad y surge el temor ante lo que cerebros malvados serán capaces de perpetrar. Y sin embargo, la ingeniería genética en sí, los procesos biotecnológicos, tienen tantos eones como la propia vida celular, previa en casi cuatro mil millones de años a la aparición de la especie humana sobre la Tierra. Sexo, simbiosis y formación de comunidades vivas de muy diferentes tipos son formas de biotecnología y de "manipulación" genética endógena que han permitido, y determinado, la evolución de la humanidad.

Las ideas científicas influyen sobre la vida cotidiana y ayudan a la formación de perspectivas nuevas y de enfoques críticos sobre el futuro del pensamiento humano. La aproximación popular a la ciencia debe desligarse de cualquier tendencia dogmática, religiosa o mágica, en la explicación de los fenómenos y en el planteamiento de sus hipótesis. Sucede, sin embargo, que puesto que muchas de las preguntas que se hace la ciencia están en la base de las inquietudes humanas –"nuestro origen, por ejemplo–, las distintas religiones y recientemente la pseudociencia han ideado respuestas para dichas preguntas. Para tranquilidad de los buenos espíritus, la ciencia no está interesada en contradecir la explicación que cada una de las religiones ofrece a esos interrogantes. Sólo, que la ciencia, esencialmente pragmática, limita la búsqueda de sus respuestas y la de sus objetos de estudio a elementos y cuestiones físicamente verificables. En todas cuantas respuestas ha dado la ciencia su objetivo no ha sido nunca

vencer a los creyentes religiosos, sino convencer a los dogmáticos, cualesquiera que sean sus atenuados.

Cuando se consideran en su conjunto las grandes incógnitas, hay que tener en cuenta la utilización y la distinción que a menudo se hace de los elementos del mundo vivo. La abstracción corriente de la unidad de la vida y su medio sobre la superficie de la Tierra tiene consecuencias que los humanos apenas hemos empezado a entender. La vida es una fuerza geológica y hace que las condiciones para su mantenimiento –adecuación de la temperatura, de la composición química del suelo y de las proporciones de gases presentes en la atmósfera– sean aportadas por la propia vida. Eugene Odum apoyó la idea de la biosfera como un sistema homeostático o cibernético formado por componentes vivos e inertes; incluso comprendió el papel fundamental que en dicho sistema desempeñaban los microorganismos. Cuando se habla de la fisiología de los mamíferos y de los mecanismos por los cuales se mantiene la temperatura corporal, o las concentraciones de calcio, sodio o potasio en sus estrechos límites, se está hablando de materia científica, no filosófica, ni teológica, ni teleológica. De igual forma, cuando nos referimos a la geofisiología, a los mecanismos que han mantenido la composición de la atmósfera lejos de un equilibrio estable a través de millones de años, nos estamos refiriendo a flujos de energía y materia que los científicos pueden investigar. Sin embargo, y como indica Ramon Margalef en su Introducción a la edición española de *La Biosfera* (3), *la ampliación de cualquier visión global a otros dominios de la ciencia o de la filosofía, en el sentido de superponer, al considerar la evolución del mundo físico, una nueva esfera en la que podrían tener cabida la mente, la inteligencia o el espíritu, era casi de prever.*

Simbiosis es la conexión física entre organismos de diferentes especies, una asociación que en ocasiones resulta extraña. Miembros de especies con una relación muy lejana pueden unirse mediante sus raíces, por medio de agujeros en su esqueleto, en la piel, por conexiones humorales o de muchas otras formas. En sentido estricto, los miembros simbiotes individuales de al menos dos especies tienen que estar en contacto la mayor parte del tiempo. Si relajamos este criterio y permitimos que ese contacto se retraiga, vemos inmediatamente que todos los seres vivos sobre la Tierra están en contacto a través del agua, la atmósfera y el suelo, y todos parecen haber hallado cobijo en la superficie de un planeta limitado.

Un descubrimiento moderno de la biología es que algunas simbiosis son contingentes. Los

socios, como los huéspedes (ambos sentidos), llegan y se van al albur de las condiciones. Otras simbiosis, una vez cubierta una etapa flexible, se convierten en asociaciones estables. A medida que los primeros huéspedes se quedan, las codependencias llevan a nuevas estructuras. Toda vida posee algún tipo de conexión con cualquier otra forma de vida. Comunidades tan complejas como las que hemos observado en el intestino de los termes, por ejemplo, han permanecido inalteradas durante millones de años (4), precisamente porque esa comunidad permite un tipo especial de vida a un conjunto de organismos de los cuales solamente nos fijamos en el más externo y mayor: el insecto.

Con pocas excepciones, las bacterias generalmente no mueren, si bien se las puede matar. Si disponen de agua en estado líquido, y de donadores y aceptores de electrones adecuados, prosiguen su crecimiento celular por división indefinida. La muerte "programada", como hecho predecible en la historia de la vida, aparece por primera vez en bacterias físicas y morfológicamente muy complejas: las cianobacterias. Dichos organismos poseen unas células diferenciadas –los heterocistes–, que llevan a cabo la fijación de nitrógeno y que son "mortales", ya que no pueden reproducirse y su muerte está programada genéticamente. Pero la muerte programada está mucho más desarrollada en los organismos que evolucionaron como comunidades bacterianas, los eucariotas. A diferencia de algunas células bacterianas (como los mencionados heterocistes de las cianobacterias), la célula de levadura –un eucariota– no se reproduce indefinidamente. Por ejemplo, observada con el microscopio electrónico de barrido, una célula de levadura en crecimiento muestra una cicatriz circular en cada lugar donde se ha formado una yema. A medida que van apareciendo más y más yemas, que se desprenden formando nuevas células, se aprecian más cicatrices en diferentes lugares de la superficie celular. Cuando hay muchas cicatrices, la célula de levadura deja de reproducirse y muere. Los animales y las plantas que se reproducen sexualmente han llevado la muerte celular aún más lejos. Debemos distinguir dos clases de células, las del cuerpo, o soma, que mueren, y las células reproductoras, o germen, que retienen su capacidad de producir nuevos organismos mediante división celular. Lo que solemos llamar la individualidad de estos organismos es en realidad una simbiosis compleja de muchos organismos que anteriormente tuvieron una vida independiente, lo cual implica ajuste e integración constantes. Una de las invenciones de la vida, la reproducción a través de la fusión sexual y la

repetición imperfecta de las formas, es un elemento clave en la evolución.

Evolución es historia; consiste en experimentar cambios a través del tiempo. Muchas veces se dice que las estrellas y galaxias, el sistema solar y los planetas, las distintas formas de vida y las sociedades, "evolucionan". La forma que toma esa "evolución" es actualmente objeto de estudio y atrae cada vez mayor atención. La superficie de nuestro planeta ha cambiado como respuesta a la vida que se desarrollaba sobre ella, de la misma manera que la propia vida ha cambiado en respuesta a la evolución de la Tierra. La biosfera es muy antigua. La Tierra viva tiene casi cuatro mil millones de años, sólo seiscientos millones de años menos que el propio planeta. La continuidad y unidad de la vida que conocemos se muestra claramente en la uniformidad de los sistemas genéticos y de la composición molecular de los organismos que la integran. La biología molecular muestra de forma convincente que toda la vida actual sobre la Tierra comparte un antecesor común. Hay pues un lazo íntimo entre evolución y organismos. La evolución conecta toda la vida a través del tiempo. Toda la vida sobre la Tierra está conectada a través del espacio-tiempo quadridimensional.

Muchos años antes de que los biólogos modernos contaran con los instrumentos para averiguar si las células debían su complejidad a microorganismos simbióticos, un naturalista ruso, el antes citado Merezhkovsky, intuyó que los cloroplastos de las plantas, esas lentejuelas verdes de las células fotosintéticas, son unos invasores "recientes", unos pasajeros que han modificado las prestaciones del vehículo al cual se han subido. Merezhkovsky se dio cuenta de que esos orgánulos celulares se parecían mucho más a las cianobacterias (en aquella época se llamaban "algas azules", aunque no son ni lo uno ni lo otro), que a cualquier otra estructura de la célula. Averiguó también que los cloroplastos se reproducen por sí mismos, independientemente del ciclo de división celular. Observó que, simplemente, se separaban por fisión, como las bacterias, pero lo hacían en los confines de la célula. Merezhkovsky y Famintsyn, que había intentado que los cloroplastos se reprodujeran en cultivo axénico, propusieron que dichos orgánulos son en realidad cianobacterias que se instalaron en un primer antecesor de las células de plantas y posteriormente perdieron su autonomía.

La célula eucariótica, provista de núcleo, es la unidad anatómica elemental que compone el cuerpo de animales, plantas y hongos; proviene de las primeras bacterias, a partir de las cuales evolucionó mediante una serie de simbiosis. El origen

de la célula eucariota es un caso especial del fenómeno general de evolución de asociaciones microbianas. La aparición de especies asociadas y su coevolución empezó como mínimo hace 3.500 millones de años y ha llegado hasta la actualidad. Las interacciones microbianas desempeñaron también un importante papel en la evolución de las células, a la vez que tuvieron efectos profundos sobre los sedimentos de la superficie de la Tierra y la atmósfera.

Hace ya más de 30 años que pisamos la Luna y tuvimos ocasión de contemplarnos desde el espacio. Desde ese mismo espacio hemos podido percibir una Tierra que es modificada por esa vida que cobija, en tanto ella misma, la Tierra, transforma a la propia vida. La evolución de la célula no es algo desconocido ni misterioso. Puede descifrarse y seguirse a través de las múltiples huellas que ha ido dejando y que nosotros, ayudados por nuestra inteligencia y tecnología, podemos interpretar. Esa interpretación puede ser conservadora, ajustándose a los límites de las teorías y explicaciones que otros han propuesto, o arriesgada, revolucionaria, yendo más allá de esos límites, aunque siempre basándose en datos que permiten la extralimitación. En ciencia no hay saltos en el vacío que puedan permanecer irresolutos por mucho tiempo; como tampoco hay errores duros.

La historia de la célula está fuertemente ligada a la de la Tierra y esto es algo que podemos comprender siguiendo el origen y la evolución de la vida a partir de su componente esencial, la célula procariótica. La evolución comprende, además de cambios genéticos en las poblaciones de organismos, cambios en los ambientes terrestres. La universalidad de la bioquímica de la reproducción es consecuencia del origen común de toda la vida en la Tierra. Todos los seres vivos que conocemos proceden de células que contenían sistemas de transmisión de información basados en la replicación del DNA y en la síntesis de proteínas dirigida por RNA mensajero.

La teoría simbiótica del origen y evolución celular se apoya en dos conceptos biológicos. El primero y fundamental es la división del mundo vivo entre organismos procaróticos y eucarióticos, entre bacterias y los otros organismos compuestos de células con núcleo, es decir, protoctistas, animales, hongos y plantas. El segundo concepto es que algunas partes de la célula eucariótica se formaron directamente a partir de asociaciones permanentes de organismos de diferentes especies. Tres clases de orgánulos (cilios, mitocondrias y plastidios fotosintéticos) fueron una vez bacterias de vida libre que, por mecanismos simbióticos,

pasaron a formar parte de otras bacterias diferentes. Una aproximación distinta, tradicional, establece una filiación directa y mantiene que las orgánulos celulares (centriolos, mitocondrias y plastidios) evolucionaron a partir de una compartimentación en el interior de las células. La teoría simbiótica entronca en gran manera con un pensamiento evolutivo como el que desarrollaron genéticos, ecólogos y citólogos, incluyendo científicos que fundieron la genética mendeliana con la selección natural de Darwin. También se apoya en campos nuevos o revitalizados como la biología molecular, especialmente el estudio de los ácidos nucleicos y la secuencia y estructura de las proteínas, la micropaleontología, que estudia las pruebas más tempranas de la vida, e incluso la química y la física atmosféricas en tanto en cuanto están relacionadas con la generación biológica de gases.

Tres circunstancias son necesarias para que tenga lugar la evolución: Reproducción, variaciones transmisibles o mutaciones y presión ambiental selectiva. Asegurada la primera, las otras dos se producen de forma irremediable. Entre las numerosas presiones ambientales, cabe mencionar variaciones en la temperatura, en la cantidad y cualidad de la luz solar, en las concentraciones de sales en el agua, etc. Es lógico pensar que, muy pronto en la evolución temprana de la célula, la fermentación de pequeñas moléculas y metabolitos universales proporcionaron energía y carbono para la síntesis de ácidos nucleicos. Cualquier organismo capaz de convertir un compuesto que estuviese disponible en otro necesario para la reproducción celular podría sobrevivir en ausencia del compuesto que anteriormente había sido necesario. La evolución del metabolismo bacteriano puede seguirse mediante el estudio de la distribución actual de las vías metabólicas de los procariotas, de las ventajas selectivas de sus productos finales y de la conservación bioquímica.

El aumento en la concentración de oxígeno en la atmósfera provocó una crisis. Anteriormente, se habían extendido las poblaciones de bacterias anaeróbicas. Ahora, la supervivencia exigía microbios capaces de tolerar el oxígeno. La respuesta de los procariotas fue extraordinariamente diversa, sobre todo cuando se compara con la aerobiosis uniforme de los eucariotas (aunque siguen conservando la capacidad anaeróbica). Grupos de microbios que presentaban una gran divergencia, como actinobacterias, bacilos, espiroquetas y cianobacterias, desarrollaron vías metabólicas diferentes, pero análogas, para enfrentarse al aumento de oxígeno. Algunos miembros de cada uno de los grupos principales de procariotas anaerobios

se volvieron tolerante para el oxígeno e incluso lo utilizó. Por lo menos unos de ellos se convirtieron en diversos tipos de mitocondrias. Cuando el oxígeno acumulado en la atmósfera alcanzó la concentración que mantiene en la actualidad, ya había muchas clases de bacterias que habitaban mares y lagos, cubrían los suelos y liberaban esporas en el aire. Estromatolitos y microfósiles, abundantes y diseminados en el tiempo y en el espacio, son testigos incontrovertibles de la edad de oro de los procariotas, mucho antes de la explosión morfológica de la vida eucariótica. La acumulación de oxígeno atmosférico puso fin a la producción abiótica de compuestos orgánicos, ya que éstos son destruidos rápidamente por el oxígeno libre. Las bacterias pasaron a establecer una estrecha interdependencia para el suministro de gases, ventilación y eliminación de los productos de desecho. Emergieron muchas clases de relaciones, incluidas la simbiosis, el parasitismo, y la depredación. Una clase de simbiosis llevó a la formación de nuevos tipos de células.

Todas las grandes innovaciones en la evolución de las células tuvieron lugar antes de la aparición de cualquier animal, planta u hongo. La principal ruta bioquímica ya había sido establecida y se habían desarrollado los patrones de mitosis, meiosis y fecundación en algunos protistas, aunque no en todos. Hace unos 700 millones de años, ciertos eucariotas heterótrofos que habían ingerido procariotas fotosintéticos devinieron en algas. Hace 400 millones de años ya puede hablarse de un asentamiento bien establecido de plantas, animales y hongos.

La Tierra, Venus y Marte son como tres sistemas hermanos, tres planetas con orígenes parecidos que ocupan lugares próximos en el sistema solar, en una zona que consideramos "habitable". Parece arriesgado afirmar esto cuando las condiciones de la Tierra, donde tenemos la certeza de que existe vida, son tan diferentes de las que se dan en los otros dos planetas. Sin embargo, estas grandes diferencias no existían al principio. Ocurrió que uno de los tres se vio sometido a una serie de fenómenos que fueron cambiando sus condiciones hasta hacerlo totalmente distinto a los otros. Éstos, Marte y Venus, siguieron una trayectoria que podríamos llamar normal, dentro de los cánones planetarios. En el otro, la Tierra, apareció un fenómeno que llamamos vida, que fue modificando su aspecto, su estructura y otras características fundamentales hasta hacerlo radicalmente diferente a sus hermanos del espacio.

El estudio de la biología moderna tiene una deuda contraída con los procariotas y ésta es la idea de que las características de la Tierra están

perfectamente diseñadas para mantener la vida tal como la conocemos. Disponemos del oxígeno que respiramos gracias a que apareció una forma de vida, se reprodujo, experimentó cambios y evolucionó. Los primeros procariotas no necesitaban una atmósfera oxigenada pero cuando el oxígeno apareció, debido a la actividad metabólica procariótica, se adaptaron al cambio y transmitieron esa característica a sus descendientes. La Tierra pudo así albergar sucesivas formas de vida, incluso la humana. Otra característica de nuestro planeta, producto asimismo de los procariotas, supone una siguiente aportación al estudio de la biología y es que todos los procesos que originaron la vida –biopoyéticos–, no son suficientes por sí mismos para asegurar la continuación y permanencia de la vida en nuestro planeta. Eso explicaría la ausencia de vida en Marte; no que nunca haya habido vida allí, sino que tal vez no prosperó. Puede que se haya originado vida muchas veces, pero la falta de otros fenómenos, la formación de un ecosistema –ecopoyesis–, no permitió que la vida siguiera adelante. La aparición de ecosistemas significa la existencia de células diferentes que aprovechan los subproductos de otras células, y la irrupción de un tercer tipo que aprovecha lo que han dejado las segundas; al final, las primeras células de esta serie utilizan lo que han producido las últimas, estableciéndose un ciclo de materia que usa la energía del sol para las transformaciones químicas. Esta aparición de ecosistemas fue esencial porque en tanto que la energía solar es aparentemente ilimitada, no sucede lo mismo con la materia que hay sobre la Tierra. Ese comportamiento de los microorganismos, aprovechamiento máximo de la energía y reciclado máximo aseguró la continuidad y permanencia de la vida sobre la Tierra. Nuestra especie, los humanos, también somos consecuencia de ello.

Referencias

1. Ramón y Cajal S. (1941) Cuentos de vacaciones. Narraciones seudocientíficas. Madrid: Espasa Calpe.
2. Otis L (2001) Ramón y Cajal, a pioneer in science fiction. *Int Microbiol* 4:175-178
3. Margalef, R. Introducción. En Vernadsky VI (ed.) *La Biosfera*. Fundación Argentina. Madrid, 1997
4. Wier A, Dolan M, Grimaldi D, Guerrero R, Wagensberg J, Margulis L. (2002) *Spirochete* and protist symbionts of a termite (*Mastotermes electrodominus*) in Miocen amber. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:1410-1413.



Temas de actualidad

La simbiosis como mecanismo de evolución

Ricardo Guerrero

Departamento de Microbiología, Universidad de Barcelona, Avda. Diagonal 645, 08028 Barcelona.
E-mail: guerrero@retemail.es

Cierto que la ciencia, rebelándose, al parecer contra el destino, ha inventado el microscopio, con la mira de sorprender tan minúsculos enemigos (y esto representa ya un fruto intelectual del microbio). Mal haríais, sin embargo, en vanagloriaros de tan grosero instrumento. Juguete harto imperfecto todavía, a su incapacidad resolutiva escapan millones de vidas infinitesimales, ultramicroscópicas: las bacterias de las bacterias; el impalpable polvo de miríadas vitales disperso en el aire, el agua y las tierras; las imperceptibles colonias intracelulares, especie de federaciones simbióticas, que ahora solamente comienzan a alborear, a título de arriesgadísimas conjeturas, en la mente de algunos sabios audaces. Algún día os será lícito quizá rastrear la morfología y costumbres de tan diminutas y ultramicroscópicas organizaciones confinantes con la nada y muy distantes aún de las más groseras construcciones moleculares. Mas para ello os será fuerza abandonar los sencillos principios de la óptica amplificante fundados sobre el fenómeno banal de la refracción de las ondas luminosas visibles (oscilaciones bastas sobre las cuales sólo ejercen influencia partículaplástico superiores a unas décimas de micra), y recurrir a radiaciones invisibles, infinitamente delicadas y todavía ignotas, de la materia imponderable. Y así y todo, la ciencia no podrá agotar los dominios de la vida. Lo invisible, infinitamente más importante que lo visible, os envolverá siempre, y cada edad tendrá sus enemigos inaccesibles, porque el alazán del progreso sólo galopa espoleado por el calcañar de la muerte.

Quien esté familiarizado con la obra de los naturalistas rusos del último tercio del siglo XIX, al leer este párrafo podría pensar que tiene en sus manos la traducción (muy elegante, por cierto) de algún texto de autores como Konstantin Sergeevich Merezhkovsky (1855-1921), Andrei Sergeevich Famintsyn (1835-1918), o Boris Mijaylovich Kozo-Polyansky (1890-1957). Sin embargo, no es necesario ir tan lejos. El texto se debe a nuestro Santiago Ramón y Cajal (1852-1934), y se encuentra en *El pesimista corregido*, uno de sus *Cuentos de vacaciones* [1]. Cajal escribió el libro en 1885, pero lo publicó 20 años más

tarde, y demuestra las aptitudes de Cajal para la ciencia ficción. El subtítulo de la obra es *Narraciones seudocientíficas*, e inicialmente tenía doce relatos, pero finalmente solamente publicó cinco: *A secreto agravio, secreta venganza, El fabricante de honradez, La casa maldita, El pesimista corregido, y El hombre natural y el hombre artificial*. Algunos de estos cuentos reflejan la fascinación de Cajal por los microorganismos y por la manera que tiene el cuerpo de luchar contra la invasión microbiana. De *Cuentos de vacaciones* se han hecho varias ediciones (por ejemplo, en la Colección Austral de Espasa Calpe) y recientemente se ha traducido al inglés (por Laura Otis, University of Illinois Press, 2001 [2]).

Siendo estudiante de medicina, Cajal escribió una novela "biológica" –así la definió él– que mostraba el cuerpo humano desde la perspectiva microbiana y como un campo de batalla entre los leucocitos y las células invasoras. Desgraciadamente, estas primeras obras, inéditas, se han perdido.

La idea de la existencia de la simbiosis, y de su papel en la evolución, no es nueva en biología. No obstante, hasta hace muy poco correspondía más bien al sector que podríamos calificar de heterodoxo, y a autores que no eran especialmente bien vistos por el núcleo central, "autorizado" y "autorizador", del pensamiento biológico moderno.

La madre naturaleza nunca se ha acomodado, y probablemente nunca vaya a hacerlo, a los deseos de dominio con que nuestra especie ha intentado doblegarla. La naturaleza es demasiado "salvaje", o demasiado "anárquica", dependiendo del trasfondo ideológico con el que se la contemple. Pero hay un dicho castellano que indica que, bien al contrario, "es muy sabia". Los gemelos idénticos, con una dotación genética semejante, nunca son absolutamente idénticos en sus manifestaciones. Por ejemplo, sus conexiones neuronales difieren tanto entre ellos como puedan diferir las de dos personas sin ningún vínculo genético. La identidad absoluta es una fantasía platónica, como lo es el absoluto control biológico. El mundo real está marcado por diferencias, ambigüedades,

impurezas, mezclas y experiencias. Los genes pueden fluir entre microorganismos en un parpadeo del tiempo geológico. La segunda ley de la termodinámica muestra una tendencia probabilística a mezclar diferencias, a romper gradientes. La naturaleza odia el vacío. Todo microbiólogo sabe del esfuerzo que cuesta mantener axénicamente una cepa bacteriana durante un período de tiempo prolongado. El mundo tangible no favorece la pureza genética. La naturaleza, impredecible y alevosa para algunos, juega ora dispersando, ora reuniendo, conjuntos variopintos de múltiples elementos.

Genes, DNA, de indiscutible origen procariótico se hallan en plantas, animales y hongos. Nuestra identidad genética se ramifica continuamente por efecto de genes bacterianos o víricos extraños, o incluso por bacterias y virus que no son patógenos invasores, sino que se integran constante y necesariamente en lo que creemos es nuestro yo más puro.

Cuando se habla de modificación genética –"manipulación" para sus detractores–, de biotecnología, se proyecta un halo de oscuridad y surge el temor ante lo que cerebros malvados serán capaces de perpetrar. Y sin embargo, la ingeniería genética en sí, los procesos biotecnológicos, tienen tantos eones como la propia vida celular, previa en casi cuatro mil millones de años a la aparición de la especie humana sobre la Tierra. Sexo, simbiosis y formación de comunidades vivas de muy diferentes tipos son formas de biotecnología y de "manipulación" genética endógena que han permitido, y determinado, la evolución de la humanidad.

Las ideas científicas influyen sobre la vida cotidiana y ayudan a la formación de perspectivas nuevas y de enfoques críticos sobre el futuro del pensamiento humano. La aproximación popular a la ciencia debe desligarse de cualquier tendencia dogmática, religiosa o mágica, en la explicación de los fenómenos y en el planteamiento de sus hipótesis. Sucede, sin embargo, que puesto que muchas de las preguntas que se hace la ciencia están en la base de las inquietudes humanas –"nuestro origen, por ejemplo–, las distintas religiones y recientemente la pseudociencia han ideado respuestas para dichas preguntas. Para tranquilidad de los buenos espíritus, la ciencia no está interesada en contradecir la explicación que cada una de las religiones ofrece a esos interrogantes. Sólo, que la ciencia, esencialmente pragmática, limita la búsqueda de sus respuestas y la de sus objetos de estudio a elementos y cuestiones físicamente verificables. En todas cuantas respuestas ha dado la ciencia su objetivo no ha sido nunca

vencer a los creyentes religiosos, sino convencer a los dogmáticos, cualesquiera que sean sus atenuados.

Cuando se consideran en su conjunto las grandes incógnitas, hay que tener en cuenta la utilización y la distinción que a menudo se hace de los elementos del mundo vivo. La abstracción corriente de la unidad de la vida y su medio sobre la superficie de la Tierra tiene consecuencias que los humanos apenas hemos empezado a entender. La vida es una fuerza geológica y hace que las condiciones para su mantenimiento –adecuación de la temperatura, de la composición química del suelo y de las proporciones de gases presentes en la atmósfera– sean aportadas por la propia vida. Eugene Odum apoyó la idea de la biosfera como un sistema homeostático o cibernético formado por componentes vivos e inertes; incluso comprendió el papel fundamental que en dicho sistema desempeñaban los microorganismos. Cuando se habla de la fisiología de los mamíferos y de los mecanismos por los cuales se mantiene la temperatura corporal, o las concentraciones de calcio, sodio o potasio en sus estrechos límites, se está hablando de materia científica, no filosófica, ni teológica, ni teleológica. De igual forma, cuando nos referimos a la geofisiología, a los mecanismos que han mantenido la composición de la atmósfera lejos de un equilibrio estable a través de millones de años, nos estamos refiriendo a flujos de energía y materia que los científicos pueden investigar. Sin embargo, y como indica Ramon Margalef en su Introducción a la edición española de *La Biosfera* (3), *la ampliación de cualquier visión global a otros dominios de la ciencia o de la filosofía, en el sentido de superponer, al considerar la evolución del mundo físico, una nueva esfera en la que podrían tener cabida la mente, la inteligencia o el espíritu, era casi de prever.*

Simbiosis es la conexión física entre organismos de diferentes especies, una asociación que en ocasiones resulta extraña. Miembros de especies con una relación muy lejana pueden unirse mediante sus raíces, por medio de agujeros en su esqueleto, en la piel, por conexiones humorales o de muchas otras formas. En sentido estricto, los miembros simbiotes individuales de al menos dos especies tienen que estar en contacto la mayor parte del tiempo. Si relajamos este criterio y permitimos que ese contacto se retraiga, vemos inmediatamente que todos los seres vivos sobre la Tierra están en contacto a través del agua, la atmósfera y el suelo, y todos parecen haber hallado cobijo en la superficie de un planeta limitado.

Un descubrimiento moderno de la biología es que algunas simbiosis son contingentes. Los

socios, como los huéspedes (ambos sentidos), llegan y se van al albur de las condiciones. Otras simbiosis, una vez cubierta una etapa flexible, se convierten en asociaciones estables. A medida que los primeros huéspedes se quedan, las codependencias llevan a nuevas estructuras. Toda vida posee algún tipo de conexión con cualquier otra forma de vida. Comunidades tan complejas como las que hemos observado en el intestino de los termes, por ejemplo, han permanecido inalteradas durante millones de años (4), precisamente porque esa comunidad permite un tipo especial de vida a un conjunto de organismos de los cuales solamente nos fijamos en el más externo y mayor: el insecto.

Con pocas excepciones, las bacterias generalmente no mueren, si bien se las puede matar. Si disponen de agua en estado líquido, y de donadores y aceptores de electrones adecuados, prosiguen su crecimiento celular por división indefinida. La muerte "programada", como hecho predecible en la historia de la vida, aparece por primera vez en bacterias físicas y morfológicamente muy complejas: las cianobacterias. Dichos organismos poseen unas células diferenciadas –los heterocistes–, que llevan a cabo la fijación de nitrógeno y que son "mortales", ya que no pueden reproducirse y su muerte está programada genéticamente. Pero la muerte programada está mucho más desarrollada en los organismos que evolucionaron como comunidades bacterianas, los eucariotas. A diferencia de algunas células bacterianas (como los mencionados heterocistes de las cianobacterias), la célula de levadura –un eucariota– no se reproduce indefinidamente. Por ejemplo, observada con el microscopio electrónico de barrido, una célula de levadura en crecimiento muestra una cicatriz circular en cada lugar donde se ha formado una yema. A medida que van apareciendo más y más yemas, que se desprenden formando nuevas células, se aprecian más cicatrices en diferentes lugares de la superficie celular. Cuando hay muchas cicatrices, la célula de levadura deja de reproducirse y muere. Los animales y las plantas que se reproducen sexualmente han llevado la muerte celular aún más lejos. Debemos distinguir dos clases de células, las del cuerpo, o soma, que mueren, y las células reproductoras, o germen, que retienen su capacidad de producir nuevos organismos mediante división celular. Lo que solemos llamar la individualidad de estos organismos es en realidad una simbiosis compleja de muchos organismos que anteriormente tuvieron una vida independiente, lo cual implica ajuste e integración constantes. Una de las invenciones de la vida, la reproducción a través de la fusión sexual y la

repetición imperfecta de las formas, es un elemento clave en la evolución.

Evolución es historia; consiste en experimentar cambios a través del tiempo. Muchas veces se dice que las estrellas y galaxias, el sistema solar y los planetas, las distintas formas de vida y las sociedades, "evolucionan". La forma que toma esa "evolución" es actualmente objeto de estudio y atrae cada vez mayor atención. La superficie de nuestro planeta ha cambiado como respuesta a la vida que se desarrollaba sobre ella, de la misma manera que la propia vida ha cambiado en respuesta a la evolución de la Tierra. La biosfera es muy antigua. La Tierra viva tiene casi cuatro mil millones de años, sólo seiscientos millones de años menos que el propio planeta. La continuidad y unidad de la vida que conocemos se muestra claramente en la uniformidad de los sistemas genéticos y de la composición molecular de los organismos que la integran. La biología molecular muestra de forma convincente que toda la vida actual sobre la Tierra comparte un antecesor común. Hay pues un lazo íntimo entre evolución y organismos. La evolución conecta toda la vida a través del tiempo. Toda la vida sobre la Tierra está conectada a través del espacio-tiempo quadridimensional.

Muchos años antes de que los biólogos modernos contaran con los instrumentos para averiguar si las células debían su complejidad a microorganismos simbióticos, un naturalista ruso, el antes citado Merezhkovsky, intuyó que los cloroplastos de las plantas, esas lentejuelas verdes de las células fotosintéticas, son unos invasores "recientes", unos pasajeros que han modificado las prestaciones del vehículo al cual se han subido. Merezhkovsky se dio cuenta de que esos orgánulos celulares se parecían mucho más a las cianobacterias (en aquella época se llamaban "algas azules", aunque no son ni lo uno ni lo otro), que a cualquier otra estructura de la célula. Averiguó también que los cloroplastos se reproducen por sí mismos, independientemente del ciclo de división celular. Observó que, simplemente, se separaban por fisión, como las bacterias, pero lo hacían en los confines de la célula. Merezhkovsky y Famintsyn, que había intentado que los cloroplastos se reprodujeran en cultivo axénico, propusieron que dichos orgánulos son en realidad cianobacterias que se instalaron en un primer antecesor de las células de plantas y posteriormente perdieron su autonomía.

La célula eucariótica, provista de núcleo, es la unidad anatómica elemental que compone el cuerpo de animales, plantas y hongos; proviene de las primeras bacterias, a partir de las cuales evolucionó mediante una serie de simbiosis. El origen

de la célula eucariota es un caso especial del fenómeno general de evolución de asociaciones microbianas. La aparición de especies asociadas y su coevolución empezó como mínimo hace 3.500 millones de años y ha llegado hasta la actualidad. Las interacciones microbianas desempeñaron también un importante papel en la evolución de las células, a la vez que tuvieron efectos profundos sobre los sedimentos de la superficie de la Tierra y la atmósfera.

Hace ya más de 30 años que pisamos la Luna y tuvimos ocasión de contemplarnos desde el espacio. Desde ese mismo espacio hemos podido percibir una Tierra que es modificada por esa vida que cobija, en tanto ella misma, la Tierra, transforma a la propia vida. La evolución de la célula no es algo desconocido ni misterioso. Puede descifrarse y seguirse a través de las múltiples huellas que ha ido dejando y que nosotros, ayudados por nuestra inteligencia y tecnología, podemos interpretar. Esa interpretación puede ser conservadora, ajustándose a los límites de las teorías y explicaciones que otros han propuesto, o arriesgada, revolucionaria, yendo más allá de esos límites, aunque siempre basándose en datos que permiten la extralimitación. En ciencia no hay saltos en el vacío que puedan permanecer irresolutos por mucho tiempo; como tampoco hay errores duraderos.

La historia de la célula está fuertemente ligada a la de la Tierra y esto es algo que podemos comprender siguiendo el origen y la evolución de la vida a partir de su componente esencial, la célula procariótica. La evolución comprende, además de cambios genéticos en las poblaciones de organismos, cambios en los ambientes terrestres. La universalidad de la bioquímica de la reproducción es consecuencia del origen común de toda la vida en la Tierra. Todos los seres vivos que conocemos proceden de células que contenían sistemas de transmisión de información basados en la replicación del DNA y en la síntesis de proteínas dirigida por RNA mensajero.

La teoría simbiótica del origen y evolución celular se apoya en dos conceptos biológicos. El primero y fundamental es la división del mundo vivo entre organismos procaróticos y eucarióticos, entre bacterias y los otros organismos compuestos de células con núcleo, es decir, protoctistas, animales, hongos y plantas. El segundo concepto es que algunas partes de la célula eucariótica se formaron directamente a partir de asociaciones permanentes de organismos de diferentes especies. Tres clases de orgánulos (cilios, mitocondrias y plastidios fotosintéticos) fueron una vez bacterias de vida libre que, por mecanismos simbióticos,

pasaron a formar parte de otras bacterias diferentes. Una aproximación distinta, tradicional, establece una filiación directa y mantiene que las orgánulos celulares (centriolos, mitocondrias y plastidios) evolucionaron a partir de una compartimentación en el interior de las células. La teoría simbiótica entronca en gran manera con un pensamiento evolutivo como el que desarrollaron genéticos, ecólogos y citólogos, incluyendo científicos que fundieron la genética mendeliana con la selección natural de Darwin. También se apoya en campos nuevos o revitalizados como la biología molecular, especialmente el estudio de los ácidos nucleicos y la secuencia y estructura de las proteínas, la micropaleontología, que estudia las pruebas más tempranas de la vida, e incluso la química y la física atmosféricas en tanto en cuanto están relacionadas con la generación biológica de gases.

Tres circunstancias son necesarias para que tenga lugar la evolución: Reproducción, variaciones transmisibles o mutaciones y presión ambiental selectiva. Asegurada la primera, las otras dos se producen de forma irremediable. Entre las numerosas presiones ambientales, cabe mencionar variaciones en la temperatura, en la cantidad y cualidad de la luz solar, en las concentraciones de sales en el agua, etc. Es lógico pensar que, muy pronto en la evolución temprana de la célula, la fermentación de pequeñas moléculas y metabolitos universales proporcionaron energía y carbono para la síntesis de ácidos nucleicos. Cualquier organismo capaz de convertir un compuesto que estuviese disponible en otro necesario para la reproducción celular podría sobrevivir en ausencia del compuesto que anteriormente había sido necesario. La evolución del metabolismo bacteriano puede seguirse mediante el estudio de la distribución actual de las vías metabólicas de los procariotas, de las ventajas selectivas de sus productos finales y de la conservación bioquímica.

El aumento en la concentración de oxígeno en la atmósfera provocó una crisis. Anteriormente, se habían extendido las poblaciones de bacterias anaeróbicas. Ahora, la supervivencia exigía microbios capaces de tolerar el oxígeno. La respuesta de los procariotas fue extraordinariamente diversa, sobre todo cuando se compara con la aerobiosis uniforme de los eucariotas (aunque siguen conservando la capacidad anaeróbica). Grupos de microbios que presentaban una gran divergencia, como actinobacterias, bacilos, espiroquetas y cianobacterias, desarrollaron vías metabólicas diferentes, pero análogas, para enfrentarse al aumento de oxígeno. Algunos miembros de cada uno de los grupos principales de procariotas anaerobios

se volvieron tolerante para el oxígeno e incluso lo utilizó. Por lo menos unos de ellos se convirtieron en diversos tipos de mitocondrias. Cuando el oxígeno acumulado en la atmósfera alcanzó la concentración que mantiene en la actualidad, ya había muchas clases de bacterias que habitaban mares y lagos, cubrían los suelos y liberaban esporas en el aire. Estromatolitos y microfósiles, abundantes y diseminados en el tiempo y en el espacio, son testigos incontrovertibles de la edad de oro de los procariotas, mucho antes de la explosión morfológica de la vida eucariótica. La acumulación de oxígeno atmosférico puso fin a la producción abiótica de compuestos orgánicos, ya que éstos son destruidos rápidamente por el oxígeno libre. Las bacterias pasaron a establecer una estrecha interdependencia para el suministro de gases, ventilación y eliminación de los productos de desecho. Emergieron muchas clases de relaciones, incluidas la simbiosis, el parasitismo, y la depredación. Una clase de simbiosis llevó a la formación de nuevos tipos de células.

Todas las grandes innovaciones en la evolución de las células tuvieron lugar antes de la aparición de cualquier animal, planta u hongo. La principal ruta bioquímica ya había sido establecida y se habían desarrollado los patrones de mitosis, meiosis y fecundación en algunos protistas, aunque no en todos. Hace unos 700 millones de años, ciertos eucariotas heterótrofos que habían ingerido procariotas fotosintéticos devinieron en algas. Hace 400 millones de años ya puede hablarse de un asentamiento bien establecido de plantas, animales y hongos.

La Tierra, Venus y Marte son como tres sistemas hermanos, tres planetas con orígenes parecidos que ocupan lugares próximos en el sistema solar, en una zona que consideramos "habitable". Parece arriesgado afirmar esto cuando las condiciones de la Tierra, donde tenemos la certeza de que existe vida, son tan diferentes de las que se dan en los otros dos planetas. Sin embargo, estas grandes diferencias no existían al principio. Ocurrió que uno de los tres se vio sometido a una serie de fenómenos que fueron cambiando sus condiciones hasta hacerlo totalmente distinto a los otros. Éstos, Marte y Venus, siguieron una trayectoria que podríamos llamar normal, dentro de los cánones planetarios. En el otro, la Tierra, apareció un fenómeno que llamamos vida, que fue modificando su aspecto, su estructura y otras características fundamentales hasta hacerlo radicalmente diferente a sus hermanos del espacio.

El estudio de la biología moderna tiene una deuda contraída con los procariotas y ésta es la idea de que las características de la Tierra están

perfectamente diseñadas para mantener la vida tal como la conocemos. Disponemos del oxígeno que respiramos gracias a que apareció una forma de vida, se reprodujo, experimentó cambios y evolucionó. Los primeros procariotas no necesitaban una atmósfera oxigenada pero cuando el oxígeno apareció, debido a la actividad metabólica procariótica, se adaptaron al cambio y transmitieron esa característica a sus descendientes. La Tierra pudo así albergar sucesivas formas de vida, incluso la humana. Otra característica de nuestro planeta, producto asimismo de los procariotas, supone una siguiente aportación al estudio de la biología y es que todos los procesos que originaron la vida –biopoyéticos–, no son suficientes por sí mismos para asegurar la continuación y permanencia de la vida en nuestro planeta. Eso explicaría la ausencia de vida en Marte; no que nunca haya habido vida allí, sino que tal vez no prosperó. Puede que se haya originado vida muchas veces, pero la falta de otros fenómenos, la formación de un ecosistema –ecopoyesis–, no permitió que la vida siguiera adelante. La aparición de ecosistemas significa la existencia de células diferentes que aprovechan los subproductos de otras células, y la irrupción de un tercer tipo que aprovecha lo que han dejado las segundas; al final, las primeras células de esta serie utilizan lo que han producido las últimas, estableciéndose un ciclo de materia que usa la energía del sol para las transformaciones químicas. Esta aparición de ecosistemas fue esencial porque en tanto que la energía solar es aparentemente ilimitada, no sucede lo mismo con la materia que hay sobre la Tierra. Ese comportamiento de los microorganismos, aprovechamiento máximo de la energía y reciclado máximo aseguró la continuidad y permanencia de la vida sobre la Tierra. Nuestra especie, los humanos, también somos consecuencia de ello.

Referencias

1. Ramón y Cajal S. (1941) Cuentos de vacaciones. Narraciones seudocientíficas. Madrid: Espasa Calpe.
2. Otis L (2001) Ramón y Cajal, a pioneer in science fiction. *Int Microbiol* 4:175-178
3. Margalef, R. Introducción. En Vernadsky VI (ed.) *La Biosfera*. Fundación Argentina. Madrid, 1997
4. Wier A, Dolan M, Grimaldi D, Guerrero R, Wagensberg J, Margulis L. (2002) *Spirochete* and protist symbionts of a termite (*Mastotermes electrodominicus*) in Miocen amber. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:1410-1413.



¿Por qué secuenciar el genoma de *Tetrahymena*?

Juan Carlos Gutiérrez

Departamento de Microbiología III. Facultad de Biología. Universidad Complutense. 28040 Madrid.
E-mail: juancar@bio.ucm.es

***Tetrahymena*: el microorganismo-modelo.**

El protozoo ciliado *Tetrahymena thermophila* constituye, junto con *Paramecium*, un microorganismo eucariota modelo dentro del grupo de los protozoos ciliados. La principal razón de ello es su elevado grado de "domesticación" en el laboratorio, junto con sus características genéticas. Las características más importantes que han hecho de este ciliado un microorganismo-modelo las podemos resumir en los siguientes puntos:

- **Su crecimiento.** Se puede cultivar en cultivo puro o axénico (tanto medio líquido como sólido) y en medio definido, lo cual es esencial para aislar mutantes auxótrofos. La densidad celular que se puede alcanzar en condiciones óptimas (32 °C) es del orden de 10^6 células/ml. Igualmente, se puede desarrollar el cultivo continuo, alcanzando niveles de biomasa muy superiores.

- **Su tamaño.** No es uno de los mayores ciliados que se conocen, pero es relativamente grande (40-50 μ m de longitud), lo que facilita la posibilidad de transformación por microinyección directamente en el macronúcleo. En la Figura 1 se muestra una micrografía obtenida por microscopía óptica de un cultivo de este microorganismo.

- **Su genoma.** Como todos los ciliados, presenta en el mismo recinto citoplasmático dos tipos de núcleos estructuralmente y funcionalmente diferentes (dimorfismo nuclear). El micronúcleo (2n) constituido por 5 pares de cromosomas metacéntricos (un número muy bajo en comparación con otros ciliados), puede sufrir mitosis y meiosis por lo que la segregación de genes micronucleares es típicamente mendeliana. Este núcleo representa la línea germinal ya que sólo interviene durante la conjugación, y no expresa su contenido durante el ciclo crecimiento-división. Por el contrario, el segundo núcleo denominado, por su mayor tamaño, macronúcleo (45n), el cual se origina a partir del micronúcleo durante la conjugación, es el transcripcionalmente activo durante toda la vida del microorganismo. Su ADN no se distribuye mitóticamente, sino que existe un reparto aproximado (amitosis) de su contenido poliploide durante la división entre las dos futuras células hijas. Por lo que, los elementos (moléculas subcromosómicas) del macronúcleo experimentan una segregación al azar (segregación fenotípica), fenómeno que a un genetista le podría recordar a la segre-

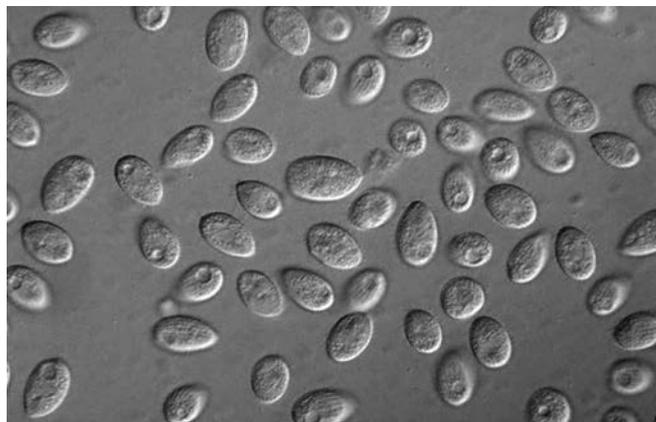


Figura 1. Células de *Tetrahymena thermophila*.

gación de plásmidos incompatibles en bacterias. Así, un heterocigoto Aa puede dar lugar, después de n divisiones, a líneas celulares separadas homocigotas AA y aa. Las piezas de ADN que constituyen el macronúcleo (unas 300 piezas autoreplicativas (ARPs) subcromosómicas acentroméricas) se pueden separar por electroforesis de campo pulsado. Y todas ellas tienen telómeros $(G_4T_2)_{50-80}$ en ambos extremos.

- **Su ciclo biológico.** *Tetrahymena* presenta una biología típicamente eucariota. Su multiplicación es exclusivamente por bipartición transversal. La división celular acompaña un complejo proceso morfogénico, en donde se elabora la ciliación de las futuras células hijas. Además del ciclo crecimiento-división, este ciliado presenta un proceso sexual (conjugación) en donde se intercambian núcleos gaméticos (pronúcleos haploides) las dos células conjugantes. Del resultado de la conjugación derivan cuatro células (cariónidas) con nuevos macronúcleos y micronúcleos. Este proceso ha sido extensamente estudiado por numerosos ciliatólogos, siendo el proceso de conjugación mejor conocido (citológica y genéticamente) entre todos los ciliados [1]. La especie *T. thermophila* tiene siete tipos conjugantes (*mating types*) diferentes, y para conjugar ambos tipos celulares han de presentar tipos conjugantes distintos. La transformación del micronúcleo (2n) en el nuevo macronúcleo (45n), una vez se han fusionado los pronúcleos (n) derivados de cada célula conjugante, constituye uno de los procesos que más ha llamado la atención a los ciliatólogos moleculares, y consiste en una intensa reorganización del ADN (fragmentación en lugares especi-

ficos en los 5 pares de cromosomas micronucleares para originar las 300 piezas subcromosómicas o minicromosomas (ARPs), adición de telómeros en los extremos y amplificación para dar las 45 copias del macronúcleo).

• **Su avanzado análisis genético.** *Tetrahymena* es uno de los ciliados en que se han desarrollado mejores herramientas para el análisis genético: fácil aislamiento y caracterización de mutantes (dominantes y recesivos) obtenidos tras mutagénesis estándar, proceso de conjugación fácilmente inducible en el laboratorio y altamente sincrónico, posibilidad de inducción de alteraciones viables de la conjugación (citogamia, exclusión genómica, bloqueo de la fusión de los pronúcleos), que conlleva la obtención de homocigosis total a ambos niveles micro- y macronuclear, o la producción de heterocariontes (micro- y macronúcleo genéticamente distintos en la misma célula), fácil mantenimiento de mutaciones letales, cepas nulisómicas (pérdida de uno o más cromosomas) o *knockouts* en estado homocigoto en el micronúcleo, o la posibilidad de mapear o localizar genes en los 5 pares de cromosomas micronucleares utilizando cepas nulisómicas [2].

• **Su avanzado análisis molecular.** Podemos transformar *Tetrahymena* por electroporación, bombardeo biolístico o microinyección. El ADN transformante se puede introducir en el micronúcleo, el macronúcleo vegetativo o desarrollándose en la conjugación (esbozo macronuclear). Se pueden construir vectores plasmídicos utilizando el ADNr macronuclear (esta molécula está representada en 9.000 copias/macronúcleo). Se puede sobre-expresar genes, ya utilizando vectores de alto número de copias como utilizando promotores inducibles de metalotioneínas (exponiendo a la célula a un metal pesado como el Cd), pudiendo incrementar la expresión génica en un rango de unas 1.000 veces. Un novedoso método, desarrollado en *T. thermophila*, hace posible la construcción y utilización de ribosomas con ARN antisentido, frente a un determinado ARNm insertado en el ARNr 26S, y no alterando la funcionalidad del ribosoma. Lo que facilita la evaluación de la no expresión de dicho gen (esencial o no para la célula).

Participación de *Tetrahymena* en descubrimientos fundamentales.

Como una consecuencia de ser un microorganismo-modelo, ampliamente utilizado en múltiples áreas de la Biología, *Tetrahymena* ha sido el protagonista único en el desarrollo de descubrimientos fundamentales o hitos realmente relevan-

tes en Biología. Estos son algunos de ellos:

- Fue el primer microorganismo eucariota en el que se desarrolló la inducción de cultivos sincrónicos, facilitando el análisis de las diferentes fases del ciclo celular eucariota [3].
- Fue uno de los sistemas vivos que participó en el descubrimiento de los lisosomas y peroxisomas [4].
- Ha sido un modelo para la identificación y purificación de los diferentes componentes de un motor celular eucariota (el cilio, base de la movilidad de los ciliados).
- Fue el sistema vivo pionero en el estudio de los telómeros, la enzima telomerasa (la primera retro-transcriptasa eucariota descubierta) y la función de los telómeros en la senescencia celular [5].
- En este ciliado se descubrió, por primera vez, la capacidad autocatalítica del ARN (ribozimas), lo que le valió a Thomas R. Cech el premio Nobel de Química en 1989. De tal manera, que los intrones del grupo I de *Tetrahymena* constituyen actualmente una de las cinco clases de ribozimas descritas (con autocatálisis intramolecular o en *cis*). Se cree que, en el futuro, una de las posibles aplicaciones de las ribozimas sea la terapia génica, inhibiendo la expresión temprana de virus oncogénicos de ADN.
- El descubrimiento, relativamente reciente, de la función de la acetilación de histonas en la expresión génica se debe a estudios realizados en este ciliado [6].

Características únicas de *Tetrahymena* a ser explotadas en un futuro.

Otras características de *Tetrahymena* que hacen de este ciliado una herramienta extremadamente útil y relevante en el futuro desarrollo de diversas áreas biológicas son:

- Su utilización en la biomonitorización de un medio acuático (como bioindicador de la presencia de contaminantes). Este ciliado se ha utilizado en la evaluación de más de 2.000 compuestos potencialmente tóxicos para el ser humano originados por diferentes procesos industriales. Al ser un microorganismo sin pared celular en estado vegetativo, su sensibilidad frente a agentes xenobióticos es mayor que cualquier microorganismo eucariota con pared celular. *Tetrahymena* es uno de los pocos microorganismos eucariotas, junto con las bacterias, en que se ha descrito mejor la aclimatación a solventes orgánicos, por lo que ofrece una oportunidad única para el estudio de dicha aclimatación. Es un excelente modelo eucariota para estudiar el estrés causado por metales pesados (sistema idóneo, por la posibilidad de análisis

genético y rápido crecimiento, en estudios ecotoxicológicos y genotoxicidad). Sus metalotioneinas (proteínas queladoras de metal pesado) son inusualmente ricas en residuos de cisteína (dominios de quelación), por lo que podrían servir como elementos en la construcción de biosensores moleculares para metales pesados [7].

- *Tetrahymena* es el hospedador natural de la bacteria patógena *Legionella*. La ruta fagocítica es reprogramada por la bacteria de una manera similar a aquella que ocurre en los macrófagos humanos. Esto hace que el binomio *Tetrahymena/ Legionella* pueda ser una magnífica oportunidad para estudiar los factores genéticos de ambos (hospedador y bacteria) involucrados en la patogenicidad bacteriana. Este ciliado es, igualmente, un potencial hábitat celular para la formación de numerosos reservorios para diversas bacterias patógenas, por lo que es un modelo excelente para desarrollar estrategias que prevengan la entrada de patógenos que reprograman la ruta fagocítica.

- Tanto en *Tetrahymena* como en *Paramecium* el ATP es un quimiorepelente. Los ciliados son los únicos microorganismos eucariotas que muestran receptores para ATP, los cuales presentan una reacción cruzada con anticuerpos frente a receptores de ATP (que al mismo tiempo son los receptores del dolor) de vertebrados [8]. Por lo tanto, este ciliado constituye una buena oportunidad para estudiar la transducción celular sensorial y las rutas de transducción de señal. Este protista responde a la morfina, la insulina e histamina, y el opioide β -endorfina afecta a la fagocitosis. *Tetrahymena* posee proteínas G, componentes de la ruta del inositol fosfolípido, protein-kinasas, sistemas adenilato ciclasa/AMPC, guanilato ciclasa/GMPc, sistemas calcio-calmodulina y óxido nítrico. En resumen, este ciliado constituye un modelo microbiano para el estudio de la inflamación, receptores del dolor, el efecto de hormonas y otros mecanismos de transducción de señal, junto con el efecto de fármacos naturales o sintéticos sobre sistemas de transducción de señal. Por todo ello, es potencialmente importante en aplicaciones farmacéuticas y biotecnológicas.

Estas son algunas de las características únicas que hacen de este ciliado un microorganismo eucariota digno de ser considerado como protagonista de un futuro proyecto de secuenciación del genoma.

Proyectos piloto de secuenciación del genoma-macronuclear *Tetrahymena/ Paramecium*: la sorpresa.

Actualmente, existen sólo dos genomas micro-

bios eucariotas completamente secuenciados; el primero fue el de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (sobre 1997-98) y el segundo ha sido completado este año (2002) en otra levadura, *Schizosaccharomyces pombe*, lo que demuestra el merecido poder de la comunidad de científicos dedicados al estudio de estos microorganismos. Igualmente, está ya muy avanzado el genoma del protozoo parásito *Plasmodium falciparum* (de interés obvio por ser el causante de la malaria). Además, existen más de una docena de proyectos de secuenciación de genomas en otros microorganismos eucariotas, algunos de los cuales son: *Leishmania*, *Giardia*, *Trypanosoma* o *Entamoeba* (todos ellos parásitos), junto con *Candida*, *Aspergillus* o *Neurospora*, entre otros. Pero entre todos ellos no encontramos todavía a ningún protozoo ciliado. Los dos mejores candidatos para abordar proyectos similares son *Tetrahymena thermophila* y/o *Paramecium*, aunque personalmente, por las múltiples razones anteriormente expuestas, pienso que el primero es un candidato más idóneo que el segundo. En ambos casos, el tamaño estimado del genoma macronuclear ha secuenciado es del orden de unas 200 Mb, similar al tamaño del genoma de la mosca del vinagre (*Drosophila*), un orden de magnitud superior al de *Saccharomyces* y unas quince veces inferior al del ser humano. A pesar de la ardua tarea que implica abordar este proyecto de secuenciación, que necesariamente implicaría la participación de varios grupos de diferentes países, junto con una buena financiación, se han llevado a cabo dos modestos proyectos piloto en ambos ciliados. El primero comenzó en 1999 en *Paramecium*, y el coordinador de los 12 grupos que participaron en este mini-proyecto fue el Dr. J. Cohen (Francia). En este proyecto se trataba de identificar y secuenciar el máximo número posible de genes macronucleares de este ciliado, para lo que se transformaron (por microinyección) una serie de cepas mutantes con diferentes fragmentos de ADN macronuclear (digestiones con varias endonucleasas), identificando por complementación la mezcla de fragmentos que lleva el gen que revierte el fenotipo mutante a silvestre, y tras fraccionación (por tamaños) de dicha mezcla se llevó a cabo la clonación de la sub-fracción y se seleccionó el clon que recupera el fenotipo silvestre. Pues bien, se obtuvo una genoteca formada por fragmentos de ADN macronuclear de un rango de 6 a 12 Kb, y con unas 3.139 secuencias codificantes de un tamaño promedio de 500 pb. Como en este ciliado hay pocos y pequeños intrones, es como secuenciar una genoteca de ADNc. Al descartarse las secuencias menores de 100 pb, el número de

secuencias se redujo a 2.990, lo que representaría una proporción del genoma del 1-2% (1,5 Mb). De todas ellas, tras su secuenciación, se identificaron unas 726 de las cuales 4 codificaban para diferentes ARNs (ARNt / ARNr) y el resto (722) para proteínas, de las cuales 9 eran genes conocidos en *Paramecium* (existentes ya en bases de datos), mientras los 713 restantes contenían marcos abiertos de lectura (ORFs) completamente nuevos [9]. Todos los cuales, de forma provisional, se han clasificado en diversas categorías funcionales, así, por ejemplo, hay 64 involucrados en el transporte celular, 82 en crecimiento, 33 en el balance iónico, etc. La sorpresa fue encontrar que muchas de las proteínas codificadas por estos genes de *Paramecium* presentan una mayor similitud con las correspondientes de los seres humanos, mientras que en otro microorganismo eucariota (con genoma completamente secuenciado) como es *Saccharomyces*, esas mismas proteínas son menos similares. Esta sorpresa (agradable para los ciliatólogos) se confirmó en el segundo proyecto-piloto, desarrollado en *Tetrahymena thermophila*. En el cual participaron sólo 4 grupos (EEUU y Canadá), y se llevó a cabo la secuenciación de varias genotecas de ADNc [10]. De los 157 clones secuenciados, el 17% se identificaron con secuencias de genes conocidos de *Tetrahymena* ya existentes en bancos de datos, mientras que un 52% del total encontraban similitud con otros organismos. Entre estas últimas, el 95% de las mismas fueron similares a proteínas humanas, y el 11% de ellas no se encontraban en otros microorganismos eucariotas (incluyendo *Saccharomyces*). En resumen, estos genes específicos de multicelularidad se presentan tanto en *Tetrahymena* como *Paramecium*, pero no así en otros microorganismos eucariotas como las levaduras.

Los protozoos ciliados surgieron hace unos 1.000 millones de años (era Proterozoica, eón Precámbrico), son más antiguos que los hongos (incluyendo las levaduras). Si recordamos el árbol filogenético de los eucariotas elaborado usando el ARNr, podemos ver que pudo existir un ancestro común para los ciliados y, por otra parte, los hongos, animales y plantas. Por lo que, los genes de multicelularidad (de biología animal) pudieran haber surgido en ese ancestro común, manteniéndose en los ciliados y perdiéndose en otros microorganismos eucariotas (las levaduras han perdido estructuras comunes en metazoos, como los centriolos). En cualquier caso, poseemos (en los ciliados) una magnífica oportunidad de atribuir funciones (genómica funcional) a muchos genes presentes igualmente en el ser humano y que se desconoce aún su función. Esta es una de las prin-

cipales razones que podemos argumentar en defensa de un futuro proyecto de secuenciación completa de genoma macronuclear de *Tetrahymena*. El propulsor más entusiasta de este gran proyecto es el Dr. E. Orias (EEUU), con el que nuestro grupo participa actualmente en un mini-proyecto sobre aislamiento y caracterización de genes de *Tetrahymena* involucrados en múltiples formas de estrés celular, lo que contribuirá, igualmente, al conocimiento del genoma macronuclear de *Tetrahymena*. Esperemos que la propuesta de la secuenciación del genoma de *Tetrahymena* (apoyada por numerosos grupos de diversos países) se haga realidad en un próximo futuro.

Bibliografía.

- Orias E. Ciliate Conjugation. En: Gall JG (ed.) The Molecular Biology of Ciliate Protozoa. Academic Press, Inc. Orlando, 1986. pp. 45-84.
- Gutiérrez JC, Orias E. (1992) Genetic characterization of *Tetrahymena thermophila* mutants unable to secrete capsules. *Developmental Genetics*. 13:160-166.
- Zeuthen E. (1958). Artificial and induced periodicity in living cells. *Adv. Biol. Med. Phys.* 6:37-73.
- Muller M, Baudhuin P, De Duve C. (1966). Lysosomes in *Tetrahymena pyriformis* I. Some properties and lysosomal localization of acid hydrolases. *J. Cell Physiol.* 68:165-175.
- Greider CW, Blackburn EH (1985). Identification of a specific telomere terminal transferase activity in *Tetrahymena* extracts. *Cell*. 43:405-413.
- Brownell JE, Zhou J, Ranalli T, Kobayashi R, Edmondson DG, Roth SY, Allis CD. (1996). *Tetrahymena* histone acetyltransferase A: a homolog to yeast Gcn5p linking histone acetylation to gene activation. *Cell*. 84:843-851.
- Gutiérrez JC, Díaz S, Benítez L, Martín-González A. (2001). Ciliated protozoa metallothioneins as biomarkers of heavy metal pollution. *Biomarkers' 2001*. (Portugal).
- Kim MY, Kuruville HG, Ragu S, Hennessey TM. (1999). ATP reception and chemosensory adaptation in *Tetrahymena thermophila*. *J. Exp. Biol.* 202: 407- 417.
- Dessen P, Zagulski M, Gromadka R, Plattner H, Kissmehl R, Meyer E, Bétermier M, Schultz JE, Linder JU, Pearlman RE, Kung C, Forney J, Satir BH, Van Houten JL, Keller A-M, Froissard M, Sperling L, Cohen J. (2001). *Paramecium* genome survey: a pilot project. *TIG*. 17:306-308.
- Fillingham JS, Chilcoat ND, Turkewitz AP, Orias E, Reith M, Pearlman RE. (2002). Analysis of expressed sequence tags (ESTs) in the ciliated protozoan *Tetrahymena thermophila*; matches to human proteins of unknown function. *J. Euk. Microbiol.* (en prensa).

¿Por qué secuenciar el genoma de *Tetrahymena*?

Juan Carlos Gutiérrez

Departamento de Microbiología III. Facultad de Biología. Universidad Complutense. 28040 Madrid.
E-mail: juancar@bio.ucm.es

***Tetrahymena*: el microorganismo-modelo.**

El protozoo ciliado *Tetrahymena thermophila* constituye, junto con *Paramecium*, un microorganismo eucariota modelo dentro del grupo de los protozoos ciliados. La principal razón de ello es su elevado grado de "domesticación" en el laboratorio, junto con sus características genéticas. Las características más importantes que han hecho de este ciliado un microorganismo-modelo las podemos resumir en los siguientes puntos:

- **Su crecimiento.** Se puede cultivar en cultivo puro o axénico (tanto medio líquido como sólido) y en medio definido, lo cual es esencial para aislar mutantes auxótrofos. La densidad celular que se puede alcanzar en condiciones óptimas (32 °C) es del orden de 10^6 células/ml. Igualmente, se puede desarrollar el cultivo continuo, alcanzando niveles de biomasa muy superiores.

- **Su tamaño.** No es uno de los mayores ciliados que se conocen, pero es relativamente grande (40-50 μ m de longitud), lo que facilita la posibilidad de transformación por microinyección directamente en el macronúcleo. En la Figura 1 se muestra una micrografía obtenida por microscopía óptica de un cultivo de este microorganismo.

- **Su genoma.** Como todos los ciliados, presenta en el mismo recinto citoplasmático dos tipos de núcleos estructuralmente y funcionalmente diferentes (dimorfismo nuclear). El micronúcleo (2n) constituido por 5 pares de cromosomas metacéntricos (un número muy bajo en comparación con otros ciliados), puede sufrir mitosis y meiosis por lo que la segregación de genes micronucleares es típicamente mendeliana. Este núcleo representa la línea germinal ya que sólo interviene durante la conjugación, y no expresa su contenido durante el ciclo crecimiento-división. Por el contrario, el segundo núcleo denominado, por su mayor tamaño, macronúcleo (45n), el cual se origina a partir del micronúcleo durante la conjugación, es el transcripcionalmente activo durante toda la vida del microorganismo. Su ADN no se distribuye mitóticamente, sino que existe un reparto aproximado (amitosis) de su contenido poliploide durante la división entre las dos futuras células hijas. Por lo que, los elementos (moléculas subcromosómicas) del macronúcleo experimentan una segregación al azar (segregación fenotípica), fenómeno que a un genetista le podría recordar a la segre-

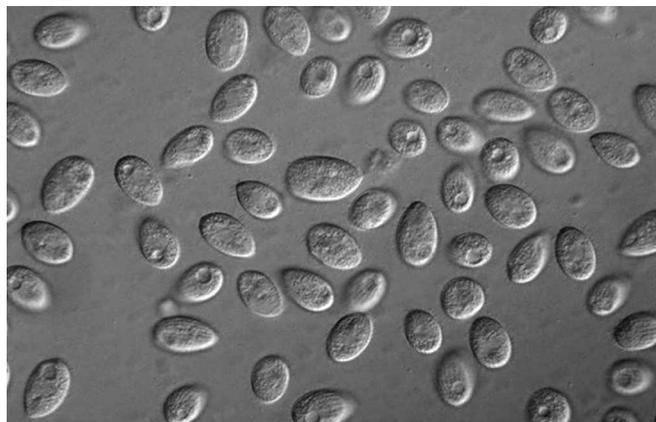


Figura 1. Células de *Tetrahymena thermophila*.

gación de plasmidos incompatibles en bacterias. Así, un heterocigoto Aa puede dar lugar, después de n divisiones, a líneas celulares separadas homocigotas AA y aa. Las piezas de ADN que constituyen el macronúcleo (unas 300 piezas autoreplicativas (ARPs) subcromosómicas acentroméricas) se pueden separar por electroforesis de campo pulsado. Y todas ellas tienen telómeros $(G_4T_2)_{50-80}$ en ambos extremos.

- **Su ciclo biológico.** *Tetrahymena* presenta una biología típicamente eucariota. Su multiplicación es exclusivamente por bipartición transversal. La división celular acompaña un complejo proceso morfogénico, en donde se elabora la ciliación de las futuras células hijas. Además del ciclo crecimiento-división, este ciliado presenta un proceso sexual (conjugación) en donde se intercambian núcleos gaméticos (pronúcleos haploides) las dos células conjugantes. Del resultado de la conjugación derivan cuatro células (cariónidas) con nuevos macronúcleos y micronúcleos. Este proceso ha sido extensamente estudiado por numerosos ciliatólogos, siendo el proceso de conjugación mejor conocido (citológica y genéticamente) entre todos los ciliados [1]. La especie *T. thermophila* tiene siete tipos conjugantes (*mating types*) diferentes, y para conjugar ambos tipos celulares han de presentar tipos conjugantes distintos. La transformación del micronúcleo (2n) en el nuevo macronúcleo (45n), una vez se han fusionado los pronúcleos (n) derivados de cada célula conjugante, constituye uno de los procesos que más ha llamado la atención a los ciliatólogos moleculares, y consiste en una intensa reorganización del ADN (fragmentación en lugares especi-

ficos en los 5 pares de cromosomas micronucleares para originar las 300 piezas subcromosómicas o minicromosomas (ARPs), adición de telómeros en los extremos y amplificación para dar las 45 copias del macronúcleo).

• **Su avanzado análisis genético.** *Tetrahymena* es uno de los ciliados en que se han desarrollado mejores herramientas para el análisis genético: fácil aislamiento y caracterización de mutantes (dominantes y recesivos) obtenidos tras mutagénesis estándar, proceso de conjugación fácilmente inducible en el laboratorio y altamente sincrónico, posibilidad de inducción de alteraciones viables de la conjugación (citogamia, exclusión genómica, bloqueo de la fusión de los pronúcleos), que conlleva la obtención de homocigosis total a ambos niveles micro- y macronuclear, o la producción de heterocariontes (micro- y macronúcleo genéticamente distintos en la misma célula), fácil mantenimiento de mutaciones letales, cepas nulisómicas (pérdida de uno o más cromosomas) o *knockouts* en estado homocigoto en el micronúcleo, o la posibilidad de mapear o localizar genes en los 5 pares de cromosomas micronucleares utilizando cepas nulisómicas [2].

• **Su avanzado análisis molecular.** Podemos transformar *Tetrahymena* por electroporación, bombardeo biolístico o microinyección. El ADN transformante se puede introducir en el micronúcleo, el macronúcleo vegetativo o desarrollándose en la conjugación (esbozo macronuclear). Se pueden construir vectores plasmídicos utilizando el ADNr macronuclear (esta molécula está representada en 9.000 copias/macronúcleo). Se puede sobre-expresar genes, ya utilizando vectores de alto número de copias como utilizando promotores inducibles de metalotioneínas (exponiendo a la célula a un metal pesado como el Cd), pudiendo incrementar la expresión génica en un rango de unas 1.000 veces. Un novedoso método, desarrollado en *T. thermophila*, hace posible la construcción y utilización de ribosomas con ARN antisentido, frente a un determinado ARNm insertado en el ARNr 26S, y no alterando la funcionalidad del ribosoma. Lo que facilita la evaluación de la no expresión de dicho gen (esencial o no para la célula).

Participación de *Tetrahymena* en descubrimientos fundamentales.

Como una consecuencia de ser un microorganismo-modelo, ampliamente utilizado en múltiples áreas de la Biología, *Tetrahymena* ha sido el protagonista único en el desarrollo de descubrimientos fundamentales o hitos realmente relevan-

tes en Biología. Estos son algunos de ellos:

- Fue el primer microorganismo eucariota en el que se desarrolló la inducción de cultivos sincrónicos, facilitando el análisis de las diferentes fases del ciclo celular eucariota [3].
- Fue uno de los sistemas vivos que participó en el descubrimiento de los lisosomas y peroxisomas [4].
- Ha sido un modelo para la identificación y purificación de los diferentes componentes de un motor celular eucariota (el cilio, base de la movilidad de los ciliados).
- Fue el sistema vivo pionero en el estudio de los telómeros, la enzima telomerasa (la primera retro-transcriptasa eucariota descubierta) y la función de los telómeros en la senescencia celular [5].
- En este ciliado se descubrió, por primera vez, la capacidad autocatalítica del ARN (ribozimas), lo que le valió a Thomas R. Cech el premio Nobel de Química en 1989. De tal manera, que los intrones del grupo I de *Tetrahymena* constituyen actualmente una de las cinco clases de ribozimas descritas (con autocatálisis intramolecular o en *cis*). Se cree que, en el futuro, una de las posibles aplicaciones de las ribozimas sea la terapia génica, inhibiendo la expresión temprana de virus oncogénicos de ADN.
- El descubrimiento, relativamente reciente, de la función de la acetilación de histonas en la expresión génica se debe a estudios realizados en este ciliado [6].

Características únicas de *Tetrahymena* a ser explotadas en un futuro.

Otras características de *Tetrahymena* que hacen de este ciliado una herramienta extremadamente útil y relevante en el futuro desarrollo de diversas áreas biológicas son:

- Su utilización en la biomonitorización de un medio acuático (como bioindicador de la presencia de contaminantes). Este ciliado se ha utilizado en la evaluación de más de 2.000 compuestos potencialmente tóxicos para el ser humano originados por diferentes procesos industriales. Al ser un microorganismo sin pared celular en estado vegetativo, su sensibilidad frente a agentes xenobióticos es mayor que cualquier microorganismo eucariota con pared celular. *Tetrahymena* es uno de los pocos microorganismos eucariotas, junto con las bacterias, en que se ha descrito mejor la aclimatación a solventes orgánicos, por lo que ofrece una oportunidad única para el estudio de dicha aclimatación. Es un excelente modelo eucariota para estudiar el estrés causado por metales pesados (sistema idóneo, por la posibilidad de análisis

genético y rápido crecimiento, en estudios ecotoxicológicos y genotoxicidad). Sus metalotioneinas (proteínas queladoras de metal pesado) son inusualmente ricas en residuos de cisteína (dominios de quelación), por lo que podrían servir como elementos en la construcción de biosensores moleculares para metales pesados [7].

• *Tetrahymena* es el hospedador natural de la bacteria patógena *Legionella*. La ruta fagocítica es reprogramada por la bacteria de una manera similar a aquella que ocurre en los macrófagos humanos. Esto hace que el binomio *Tetrahymena/ Legionella* pueda ser una magnífica oportunidad para estudiar los factores genéticos de ambos (hospedador y bacteria) involucrados en la patogenicidad bacteriana. Este ciliado es, igualmente, un potencial hábitat celular para la formación de numerosos reservorios para diversas bacterias patógenas, por lo que es un modelo excelente para desarrollar estrategias que prevengan la entrada de patógenos que reprograman la ruta fagocítica.

• Tanto en *Tetrahymena* como en *Paramecium* el ATP es un quimiorepelente. Los ciliados son los únicos microorganismos eucariotas que muestran receptores para ATP, los cuales presentan una reacción cruzada con anticuerpos frente a receptores de ATP (que al mismo tiempo son los receptores del dolor) de vertebrados [8]. Por lo tanto, este ciliado constituye una buena oportunidad para estudiar la transducción celular sensorial y las rutas de transducción de señal. Este protista responde a la morfina, la insulina e histamina, y el opioide β -endorfina afecta a la fagocitosis. *Tetrahymena* posee proteínas G, componentes de la ruta del inositol fosfolípido, protein-kinasas, sistemas adenilato ciclasa/AMPC, guanilato ciclasa/GMPc, sistemas calcio-calmodulina y óxido nítrico. En resumen, este ciliado constituye un modelo microbiano para el estudio de la inflamación, receptores del dolor, el efecto de hormonas y otros mecanismos de transducción de señal, junto con el efecto de fármacos naturales o sintéticos sobre sistemas de transducción de señal. Por todo ello, es potencialmente importante en aplicaciones farmacéuticas y biotecnológicas.

Estas son algunas de las características únicas que hacen de este ciliado un microorganismo eucariota digno de ser considerado como protagonista de un futuro proyecto de secuenciación del genoma.

Proyectos piloto de secuenciación del genoma-macronuclear *Tetrahymena/ Paramecium*: la sorpresa.

Actualmente, existen sólo dos genomas micro-

bios eucariotas completamente secuenciados; el primero fue el de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (sobre 1997-98) y el segundo ha sido completado este año (2002) en otra levadura, *Schizosaccharomyces pombe*, lo que demuestra el merecido poder de la comunidad de científicos dedicados al estudio de estos microorganismos. Igualmente, está ya muy avanzado el genoma del protozoo parásito *Plasmodium falciparum* (de interés obvio por ser el causante de la malaria). Además, existen más de una docena de proyectos de secuenciación de genomas en otros microorganismos eucariotas, algunos de los cuales son: *Leishmania*, *Giardia*, *Trypanosoma* o *Entamoeba* (todos ellos parásitos), junto con *Candida*, *Aspergillus* o *Neurospora*, entre otros. Pero entre todos ellos no encontramos todavía a ningún protozoo ciliado. Los dos mejores candidatos para abordar proyectos similares son *Tetrahymena thermophila* y/o *Paramecium*, aunque personalmente, por las múltiples razones anteriormente expuestas, pienso que el primero es un candidato más idóneo que el segundo. En ambos casos, el tamaño estimado del genoma macronuclear ha secuenciado es del orden de unas 200 Mb, similar al tamaño del genoma de la mosca del vinagre (*Drosophila*), un orden de magnitud superior al de *Saccharomyces* y unas quince veces inferior al del ser humano. A pesar de la ardua tarea que implica abordar este proyecto de secuenciación, que necesariamente implicaría la participación de varios grupos de diferentes países, junto con una buena financiación, se han llevado a cabo dos modestos proyectos piloto en ambos ciliados. El primero comenzó en 1999 en *Paramecium*, y el coordinador de los 12 grupos que participaron en este mini-proyecto fue el Dr. J. Cohen (Francia). En este proyecto se trataba de identificar y secuenciar el máximo número posible de genes macronucleares de este ciliado, para lo que se transformaron (por microinyección) una serie de cepas mutantes con diferentes fragmentos de ADN macronuclear (digestiones con varias endonucleasas), identificando por complementación la mezcla de fragmentos que lleva el gen que revierte el fenotipo mutante a silvestre, y tras fraccionación (por tamaños) de dicha mezcla se llevó a cabo la clonación de la sub-fracción y se seleccionó el clon que recupera el fenotipo silvestre. Pues bien, se obtuvo una genoteca formada por fragmentos de ADN macronuclear de un rango de 6 a 12 Kb, y con unas 3.139 secuencias codificantes de un tamaño promedio de 500 pb. Como en este ciliado hay pocos y pequeños intrones, es como secuenciar una genoteca de ADNc. Al descartarse las secuencias menores de 100 pb, el número de

secuencias se redujo a 2.990, lo que representaría una proporción del genoma del 1-2% (1,5 Mb). De todas ellas, tras su secuenciación, se identificaron unas 726 de las cuales 4 codificaban para diferentes ARNs (ARNt / ARNr) y el resto (722) para proteínas, de las cuales 9 eran genes conocidos en *Paramecium* (existentes ya en bases de datos), mientras los 713 restantes contenían marcos abiertos de lectura (ORFs) completamente nuevos [9]. Todos los cuales, de forma provisional, se han clasificado en diversas categorías funcionales, así, por ejemplo, hay 64 involucrados en el transporte celular, 82 en crecimiento, 33 en el balance iónico, etc. La sorpresa fue encontrar que muchas de las proteínas codificadas por estos genes de *Paramecium* presentan una mayor similitud con las correspondientes de los seres humanos, mientras que en otro microorganismo eucariota (con genoma completamente secuenciado) como es *Saccharomyces*, esas mismas proteínas son menos similares. Esta sorpresa (agradable para los ciliatólogos) se confirmó en el segundo proyecto-piloto, desarrollado en *Tetrahymena thermophila*. En el cual participaron sólo 4 grupos (EEUU y Canadá), y se llevó a cabo la secuenciación de varias genotecas de ADNc [10]. De los 157 clones secuenciados, el 17% se identificaron con secuencias de genes conocidos de *Tetrahymena* ya existentes en bancos de datos, mientras que un 52% del total encontraban similitud con otros organismos. Entre estas últimas, el 95% de las mismas fueron similares a proteínas humanas, y el 11% de ellas no se encontraban en otros microorganismos eucariotas (incluyendo *Saccharomyces*). En resumen, estos genes específicos de multicelularidad se presentan tanto en *Tetrahymena* como *Paramecium*, pero no así en otros microorganismos eucariotas como las levaduras.

Los protozoos ciliados surgieron hace unos 1.000 millones de años (era Proterozoica, eón Precámbrico), son más antiguos que los hongos (incluyendo las levaduras). Si recordamos el árbol filogenético de los eucariotas elaborado usando el ARNr, podemos ver que pudo existir un ancestro común para los ciliados y, por otra parte, los hongos, animales y plantas. Por lo que, los genes de multicelularidad (de biología animal) pudieran haber surgido en ese ancestro común, manteniéndose en los ciliados y perdiéndose en otros microorganismos eucariotas (las levaduras han perdido estructuras comunes en metazoos, como los centriolos). En cualquier caso, poseemos (en los ciliados) una magnífica oportunidad de atribuir funciones (genómica funcional) a muchos genes presentes igualmente en el ser humano y que se desconoce aún su función. Esta es una de las prin-

cipales razones que podemos argumentar en defensa de un futuro proyecto de secuenciación completa de genoma macronuclear de *Tetrahymena*. El propulsor más entusiasta de este gran proyecto es el Dr. E. Orias (EEUU), con el que nuestro grupo participa actualmente en un mini-proyecto sobre aislamiento y caracterización de genes de *Tetrahymena* involucrados en múltiples formas de estrés celular, lo que contribuirá, igualmente, al conocimiento del genoma macronuclear de *Tetrahymena*. Esperemos que la propuesta de la secuenciación del genoma de *Tetrahymena* (apoyada por numerosos grupos de diversos países) se haga realidad en un próximo futuro.

Bibliografía.

- Orias E. Ciliate Conjugation. En: Gall JG (ed.) The Molecular Biology of Ciliate Protozoa. Academic Press, Inc. Orlando, 1986. pp. 45-84.
- Gutiérrez JC, Orias E. (1992) Genetic characterization of *Tetrahymena thermophila* mutants unable to secrete capsules. *Developmental Genetics*. 13:160-166.
- Zeuthen E. (1958). Artificial and induced periodicity in living cells. *Adv. Biol. Med. Phys.* 6:37-73.
- Muller M, Baudhuin P, De Duve C. (1966). Lysosomes in *Tetrahymena pyriformis* I. Some properties and lysosomal localization of acid hydrolases. *J. Cell Physiol.* 68:165-175.
- Greider CW, Blackburn EH (1985). Identification of a specific telomere terminal transferase activity in *Tetrahymena* extracts. *Cell*. 43:405-413.
- Brownell JE, Zhou J, Ranalli T, Kobayashi R, Edmondson DG, Roth SY, Allis CD. (1996). *Tetrahymena* histone acetyltransferase A: a homolog to yeast Gcn5p linking histone acetylation to gene activation. *Cell*. 84:843-851.
- Gutiérrez JC, Díaz S, Benítez L, Martín-González A. (2001). Ciliated protozoa metallothioneins as biomarkers of heavy metal pollution. *Biomarkers' 2001*. (Portugal).
- Kim MY, Kuruvilla HG, Ragu S, Hennessey TM. (1999). ATP reception and chemosensory adaptation in *Tetrahymena thermophila*. *J. Exp. Biol.* 202: 407- 417.
- Dessen P, Zagulski M, Gromadka R, Plattner H, Kissmehl R, Meyer E, Bétermier M, Schultz JE, Linder JU, Pearlman RE, Kung C, Forney J, Satir BH, Van Houten JL, Keller A-M, Froissard M, Sperling L, Cohen J. (2001). *Paramecium* genome survey: a pilot project. *TIG*. 17:306-308.
- Fillingham JS, Chilcoat ND, Turkewitz AP, Orias E, Reith M, Pearlman RE. (2002). Analysis of expressed sequence tags (ESTs) in the ciliated protozoan *Tetrahymena thermophila*; matches to human proteins of unknown function. *J. Euk. Microbiol.* (en prensa).

Microbiología clínica en fauna salvaje

José Esteban García de los Ríos, Pedro Antonio Jiménez Gómez,
María Paloma Reche Sainz e Irene Rodríguez González

Sección de Microbiología. Facultad de Ciencias Experimentales y de la Salud,
Universidad San Pablo CEU, Ctra. Boadilla del Monte km. 5,3. 28668 Boadilla del Monte, Madrid.

E-mail: jgarios@ceu.es

Los Centros de Recuperación y Hospitales de Fauna Salvaje son entidades, generalmente promovidas por ONGs, que desempeñan un importante papel en el mantenimiento de la biodiversidad. Estos Centros reciben actualmente un gran número de pacientes de muy diversas especies, predominando en el interior de la Península Ibérica las pertenecientes a las rapaces. De esta forma, en los últimos años hemos podido aprender mucho sobre las patologías, los métodos de diagnóstico y tratamiento de las enfermedades de la fauna salvaje. Para llegar a estos resultados es necesario una aproximación multidisciplinar a nuestros estudios en los que se conjugan las aportaciones de los veterinarios, etólogos, anatomopatólogos y, por supuesto, microbiólogos.

Las dificultades que nos encontramos a la hora de intervenir en la fauna salvaje, si las compramos con la clínica humana, son variadas. En primer lugar, el número de especies que se reciben es elevado, presentando importantes diferencias fisiológicas, anatómicas y funcionales, lo que complica el diagnóstico, la interpretación de los resultados, el tratamiento y la evolución del paciente. En segundo lugar, la mayoría de los animales salvajes, como mecanismo de supervivencia, no presentan signos clínicos hasta que están gravemente enfermos y, además, estos síntomas son muy vagos y comunes a muchas enfermedades muy diferentes. La ausencia de síntomas o su inespecificidad hacen el diagnóstico muy complicado. Una última dificultad es la que supone el manejo del paciente para el examen físico, toma de muestras, diagnóstico, tratamiento y rehabilitación. La mayoría de los pacientes, incluidos los que toleran la presencia humana, no están acostumbrados al manejo, por lo que requieren medios especiales.

La ley 4/1989 de Conservación de los Espacios Naturales y de la Flora y Fauna Silvestres establece, en su artículo 26 (apartado 4), que quedan prohibidos la captura, posesión, tráfico y comercio de ejemplares, vivos o muertos, de animales silvestres, especialmente los incluidos en el Catálogo Nacional de Especies Amenazadas. Debido a esta ley, la única fuente de muestras en fauna salvaje son los Centros de Recuperación y Hospitales de Fauna Salvaje. A nuestro laboratorio llegan habitualmente tres tipos de muestras microbiológicas. En primer lugar, las que proceden de casos clíni-

cos de animales atendidos en el Hospital. En segundo lugar, los órganos procedentes de necropsias de animales que llegan muertos al Centro. Por último, muestras procedentes de los programas de cría que desarrollan las diferentes Organizaciones. En este caso, son huevos abortados por motivos desconocidos y muestras para el control de patógenos. En los tres tipos de muestras destacan mayoritariamente los aislamientos de Gram-negativas y, sobre todo, *Enterobacteriaceae*. Las especies detectadas han sido muchas, por lo que pasaremos a tratar de las más representativas.

Las cepas de *E. coli* patógenas en humanos que, a veces, se pueden asociar a animales son las Enteropatógenas (EPEC), Enterotoxigénicas (ETEC), Enteroinvasivas (EIEC), Enterohemorrágicas (EHEC), Enteroagregativas (EaggEC), Uropatógenas (UPEC) y las de Meningitis Neonatal (NMEC). Algunas de éstas han sido aisladas de animales salvajes, como es el caso de las EHEC en ciervos de varios países, o las UPEC, en colibacilosis en avifauna salvaje (O2 K1 y O1 K1 coinciden en el antígeno somático), lo cual es lógico, puesto que al ser eliminados por la orina, estarán presentes en aguas y otros lugares relacionados con la contaminación. Las cepas NMEC se caracterizan por la posesión del antígeno capsular K1, un polisacárido química y antigénicamente idéntico al polisacárido B de *Neisseria meningitidis*. Este polisacárido lo presentan algunos aislados en avifauna salvaje (O2 K1 y O1 K1, coinciden en el antígeno capsular). Cuando *E. coli* actúa como parásito intestinal, tiene genes de virulencia que le facilitan esa forma de vida, induciendo y descubriendo las adhesinas correspondientes. Por el contrario, cuando la infección es sistémica, caso que nos encontramos con más frecuencia en fauna salvaje, *E. coli* induce la producción de su polisacárido capsular que, con su poder antifagocitario, le mantiene más protegido de la fagocitosis en sangre o en los tejidos. De ahí la coincidencia de la presencia del antígeno K1 en las cepas NMEC y alguno de los aislados en avifauna salvaje.

A las cepas citadas como patógenas en humanos, hay que añadir el grupo de las denominadas APEC (*Avian Pathogenic E. coli*), patógenas en aves de consumo, en las que causan aerosaculitis, poliserositis y otras afecciones extraintestinales. Son



Dos buhos del Hospital de Fauna Salvaje de GREFA (Foto: Jordi Colás)

cepas productoras de fimbrias F1 y de aerobactina, sideróforo relacionado con la infección sistémica. En nuestras muestras procedentes de aves salvajes nos hemos encontrado serotipos de APEC ya descritos en aves de abasto y otros no tipables, lo que implicaría su pertenencia a serotipos nuevos. En los casos clínicos de colibacilosis sistémica, las cepas aisladas eran productoras de aerobactina. En estos casos, ante el aislamiento de *E. coli* en varios órganos, se plantea la comprobación de si las cepas aisladas son la misma y si se trata de una cepa capaz de desencadenar una septicemia. Para comprobar los diagnósticos hemos empleado la ribotipificación con sonda usando como enzimas *ClaI* y *MluI*. Tanto la *ClaI*-ribotipificación como la *MluI*-ribotipificación resultaron buenas herramientas para discriminar entre cepas de *E. coli* en diferentes casos clínicos. Para establecer el carácter invasivo, la duración de la enfermedad y las lesiones en los órganos recurrimos a un modelo animal en pollos de gallina.

La incidencia de *Salmonella* en fauna salvaje es mas baja, si la comparamos con *E. coli*. El porcentaje de aislamientos en rapaces de vida libre ha sido inferior al 5% en los últimos años. En el caso de rapaces algunos años en cautividad hemos obtenido números superiores, pero se trata de casos de diseminación de un brote. En aves no rapaces de vida libre encontramos prevalencia superior al 11%, y mayor al 7% en las cautivas, aunque no se puede sacar ninguna conclusión de estas cifras, por ser muestras con números muy diferentes y coincidir también con algunos brotes. Todos nuestros aislados han sido caracterizados como *Salmonella enterica* subsp. *enterica*, aunque pertenecientes a diferentes serotipos y fagotipos. En general, el serotipo y el fagotipo siguen siendo los marcadores epidemiológicos eficaces en

Salmonella, aunque, cuando se trata de brotes concretos, hemos tenido que recurrir a métodos de tipificación genéticos. En un brote de *Salmonella* serotipo Havana, que afectó a varias especies de animales residentes en el Hospital de Fauna Salvaje de GREFA, recurrimos a AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*). En brotes de *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium DT160 que aislamos asociados a mortandad de gorriones hubo que recurrir a ribotipificación, IS200-tipificación y electroforesis en campo pulsado para resolverlos adecuadamente.

Entre otros casos, debidos a otras *Enterobacteriaceae*, podemos citar algunos particularmente interesantes: En primer lugar, dos casos de septicemia por *Yersinia pseudotuberculosis*, un cernícalo común y un pollo de buitre, que serán las primeras descripciones de pseudotuberculosis en rapaces. En segundo lugar, varios casos, no relacionados entre sí, de rapaces y no rapaces con septicemia por *Serratia marcescens*. Y, por último, diferentes casos clínicos con afecciones renales fatales, producidas por *Klebsiella pneumoniae*, en azor, ardilla, búho chico y gaviota reidora.

Una segunda familia importante que se aísla en fauna salvaje es *Chlamydiaceae*. Anteriormente constaba de un único género, *Chlamydia*, que se ha dividido en dos géneros, *Chlamydia* y *Chlamydophila*. Se han añadido dos nuevas especies, *Chlamydia muridarum* y *Chlamydia suis* que, junto con *Chlamydia trachomatis*, constituyen el género *Chlamydia*. El nuevo género, *Chlamydophila*, incorpora las especies *Chlamydia pecorum*, *Chlamydia pneumoniae* y *Chlamydia psittaci*, para dar lugar a *Chlamydophila pecorum*, *Chlamydophila pneumoniae* y *Chlamydophila psittaci*. Por último, aparecen tres nuevas especies derivadas de *Chlamydia psittaci*: *Chlamydophila abortus*, *Chlamydophila caviae* y *Chlamydophila felis*.

Chlamydophila psittaci se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza, pudiéndose aislar a partir de un gran número de animales. Esta especie es especialmente contagiosa, agente de la psitacosis u ornitosis característica de las aves. La información acerca de la prevalencia de la infección por clamidia en aves salvajes es muy reducida, existiendo muy pocas investigaciones a este respecto, aunque parece que su incidencia, especialmente en rapaces, es muy baja. Las aves infectadas pueden liberar el agente infeccioso a través de las heces, orina, exudados respiratorios y oculares, produciéndose la dispersión del mismo a través de las corrientes de aire. La ingestión de la bacteria conlleva a la infección de las células epiteliales. También puede haber transmisión ver-

tical que produciría la infección del huevo. Sin embargo, existen marcadas diferencias en la susceptibilidad del huésped dependiendo de la especie del mismo, así como también de la edad del individuo siendo los más jóvenes los que son más susceptibles a la bacteria, que puede desencadenar, en muchos casos, la muerte de los mismos. Los signos clínicos más característicos son un debilitamiento en el plumaje, hipotermia, letargia disnea y deshidratación. Existe también el estado subclínico, característico de las especies con una reducida susceptibilidad o de aquellas infectadas con una cepa de virulencia moderada, apareciendo diarrea y conjuntivitis principalmente. En el estado asintomático, el animal puede eliminar el agente infeccioso a través de las materias fecales. Por tanto, se ha de considerar la posible transmisión del agente infeccioso en aves en cautividad, ya que la existencia de una sola ave infectada por esta bacteria es suficiente para que todas las demás se encuentren expuestas al agente infeccioso, aunque esto no implique que desarrollen la infección. Las infecciones con psitacosis, linfogranuloma venéreo y tracoma constituyen la quinta causa de las infecciones bacterianas asociadas a laboratorio. El contacto y exposición a aerosoles infecciosos en el manejo, cuidado o necropsias de aves infectadas son la principal fuente de psitacosis asociada a laboratorio. Las clamidias se pueden encontrar en tejidos, heces, secreciones nasales y sangre de los animales infectados. Se recomiendan las precauciones propias de un Nivel 2 de Biopeligrosidad. Por esta razón, mientras no dispongamos de los medios adecuados, nos estamos limitando a la simple detección de la presencia de estos microorganismos.

Uno de los métodos que nos permite un diagnóstico rápido de *Chlamydia* en animales tanto sintomáticos como asintomáticos es la realización de un ELFA (*Enzyme Linked Fluorescent Assay*) automático mediante el MiniVIDAS de BioMérieux. Actualmente estamos tratando de optimizar un protocolo para la extracción y detección mediante PCR. Con las limitaciones anteriormente expuestas, sin llegar a obtener resultados que determinen el alcance global de estos microorganismos, nuestros resultados apuntan a la presencia de clamidia en poblaciones de aves salvajes en la naturaleza, siendo causa directa de abortos e inviabilidad de pollos.

Algunos países emplean más de la mitad de su producción de compuestos antimicrobianos en el sector agroalimentario (ganadería, pesca y producción vegetal), usándose la mayor parte en el ganado para estimular el crecimiento. La administración de antibióticos a los animales puede pro-



José Esteban García de los Ríos (2° por la izq.) es Doctor en Biología por la Universidad Complutense de Madrid. Profesor de Microbiología, actualmente es Director de la Sección de Microbiología en la Facultad de CC Experimentales y de la Salud, Universidad San Pablo CEU de Madrid. Ha trabajado en el campo de la Fitopatología sobre *Pseudomonas savastanoi* y el complejo *Erwinia herbicola-Enterobacter agglomerans*. En los últimos años su trabajo se ha centrado en la Microbiología Clínica en Fauna Salvaje, en colaboración con diversos Centros de Recuperación y Hospitales de Fauna Salvaje. Pertenece a la Wildlife Disease Association. El Grupo de Investigación que dirige, trabaja en Proyectos Relacionados con la Resistencia a Antibióticos y Marcadores Moleculares en Bacterias de origen Clínico y Animal.

Pedro Antonio Jiménez Gómez (3° por la izq.) es Doctor en Biología por la Universidad San Pablo CEU de Madrid, Profesor de Microbiología en la Facultad de CC Experimentales y de la Salud. Actualmente es Coordinador de Microbiología del Hospital de Fauna Salvaje de GREFA y de otros Centros de Recuperación. Su trabajo de tesis se tituló Estudio de Diversos Grupos Bacterianos con Relevancia Clínica en Hospitales de Fauna Salvaje.

María Paloma Reche Sainz (4ª por la izq.) es Doctora en Farmacia por la Universidad San Pablo CEU de Madrid y Profesora de Microbiología en la Facultad de CC Experimentales y de la Salud. Beca Erasmus en el *Centre Hospitalier Regional de Nantes* (Francia), donde desarrolló su Tesina de Licenciatura "Étude bactériologique et épidémiologique des souches de *E. coli* productrices de bêta-lactamases du type TRI". Su trabajo de tesis se tituló Estudio Epidemiológico de aislados de *Salmonella* spp. procedentes de aves salvajes. Pertenece a la Raptor Research Foundation.

Irene Rodríguez González (1ª por la izq.) es Licenciada en Farmacia por la Universidad San Pablo CEU de Madrid, su trabajo de investigación sobre el que está haciendo el doctorado es Integrones de Clase I en *Enterobacteriaceae* de origen humano y animal.

ducir la selección de bacterias resistentes a los antibióticos en la población animal que después puede extenderse a los humanos a través de la

cadena alimentaria. Esta situación ha llevado a un serio aumento y diseminación de bacterias multirresistentes, no sólo entre las patógenas, sino también entre las bacterias comensales, constituyendo un reservorio de genes de resistencia para las patógenas. La fauna salvaje no se encuentra aislada de la cadena alimentaria, por lo que muchos de los fenómenos observables en ganadería y en clínica humana los estamos observando en estos animales. De forma rutinaria, todos los aislamientos que proceden de casos clínicos, son sometidos a antibiograma, no solo para establecer los posibles tratamientos, sino también para estudiar las resistencias en aquellos casos en los que sus fenotipos nos indican que pueden ser de interés. El estudio de cepas resistentes lo hemos limitado, por razones prácticas, a las *Enterobacteriaceae* y entre los antibióticos, hemos empezado centrándonos en el estudio de algunos de los que se emplean en veterinaria y ganadería, β -lactámicos y quinolonas, aunque actualmente estamos ampliando la investigación a integrones portadores de multirresistencia.

Las principales resistencias a quinolonas se deben a mutaciones en la DNA-girasa y en la topoisomerasa IV. Una vez constatado el fenotipo de resistencia mediante antibiogramas por difusión y determinación de la CMI, detectamos el genotipo de resistencia, buscando las mutaciones en las subunidades de ambas enzimas. Para ello amplificamos y secuenciamos las regiones determinantes de la resistencia a quinolonas, buscando mutaciones en los genes *gyrA* y *gyrB*. En la topoisomerasa IV, buscamos las mutaciones en el gen *parC* y en el *parE*. En la actualidad, tenemos aislados, secuenciados y depositados en el *Gene Bank* de la NCBI, 44 genes de resistencia de *Salmonella* y *E. coli*, y hemos enviado para su publicación algunos trabajos. La principal mutación de resistencia que hemos encontrado en *E. coli* ha sido en *gyrA*, en la región determinante de resistencia a quinolonas (QRDR), que supone un cambio de la serina en posición 83 por una leucina, como se detecta en clínica humana. Se trata de un cambio tan pequeño, que no afecta a la actividad de la enzima, lo que nos explicaría su persistencia en el medio ambiente.

La resistencia a β -lactámicos en *Enterobacteriaceae* se debe principalmente a la producción de β -lactamasas, por lo que nos hemos centrado en el aislamiento y caracterización de estas enzimas en nuestros aislamientos. Entre las β -lactamasas detectadas a partir de cepas procedentes de fauna salvaje, podemos dar algunos datos: El 60% de los aislados de *E. coli* con β -lactamasas, la enzima detectada era AmpC y, en un caso, una cepa

hiperproductora. También detectamos AmpC en *Serratia marcescens*, *Enterobacter cloacae*, *Morganella morganii* y *Citrobacter freundii*. Entre las β -lactamasas plasmídicas, destaca, no sólo en *E. coli*, la presencia de TEM1, en algunos casos simultáneamente con AmpC, e hiperproducción de TEM1 con resistencia a los inhibidores. En *Salmonella* hemos detectado TEM1 y TEM2. Finalmente, en casi todas las cepas de *Klebsiella pneumoniae*, hemos detectado β -lactamasas cromosómicas tipo SHV1.

Desde que se estudió el transposón Tn21, muchos fenotipos de multirresistencia se han asociado a integrones. La evolución y diseminación de las bacterias portadoras de estas estructuras, así como de los genes de resistencia es uno de los aspectos importantes que estamos desarrollando. En ese sentido, en nuestros estudios preliminares, ya hemos podido constatar la existencia de integrones de clase I en aislados de origen humano y animal, no descritos en la bibliografía.

Finalmente, queremos destacar que estos trabajos que venimos desarrollando, no son solamente investigación básica para incrementar nuestro conocimiento microbiológico. También suponen un apoyo, aún no podemos valorar su cuantía, al mejor conocimiento y a la conservación de nuestras especies salvajes. De hecho, la demanda de análisis microbiológico por parte de los Centros de Recuperación se ha incrementado notablemente en los últimos años, y cada vez son más las Organizaciones, procedentes de distintas Comunidades Autónomas, que acuden a nosotros.

Agradecimientos

Estos trabajos se llevan a cabo gracias al Proyecto de Investigación "Aplicación de nuevas técnicas moleculares al estudio de la microbiota normal y patógena de origen humano y animal", Proyecto 13/99 de la Facultad de Ciencias Experimentales y de la Salud, Universidad San Pablo CEU de Madrid.

Agradecemos la colaboración de los Centros de Recuperación y Hospitales de Fauna Salvaje: GREFA (Grupo para la Recuperación de la Fauna Autóctona y su Hábitat), AMUS (Asociación por el Mundo Salvaje), Brinzal y DEMA (Grupo de Defensa Medioambiental), Delegación Provincial de Cádiz de la Consejería de Medio Ambiente de Andalucía, CRAS-Zoológico de Jerez, Esparvel de Toledo, C. Rodríguez de la Estación Biológica de Doñana y J. Compañ de la Delegación de Medio Ambiente del Ayuntamiento de Colmenar Viejo (Madrid)

Al Dr A. Ramis, del Servei de Diagnòstic de Patologia Veterinària, Facultat de Veterinària de la

Universitat Autònoma de Barcelona.

Por último, nuestro reconocimiento a la ayuda prestada en el serotipado a los Doctores M.A. Usera y A. Echeíta, de la Sección de Enterobacterias en el Servicio de Bacteriología del Centro Nacional de Microbiología, y al Dr J. Blanco, Laboratorio de Referencia de *E. coli*, Facultad de Veterinaria, Universidad de Santiago de Compostela, Lugo.

Bibliografía

- Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. (1995). A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 39: 1211-1233.
- Cambau E, Gutmann L. (1993). Mechanisms of resistance to quinolones. *Drugs*, 45: 15-23.
- Goldstein C, Lee MD, Sánchez S, Hudson C, Phillips B, Register B, Grady M, Liebert C, Summers AO, White DG, Maurer JJ. (2001). Incidence of Class 1 and 2 Integrases in Clinical and Commensal Bacteria from Livestock, Companion Animals, and Exotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45: 723-726.
- Livermore DM. (1995). β -lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin. Microbiol. Rev.*, 8: 557-584.
- Morishita TY, Aye PP, Brooks DL. (1997). A survey of diseases of raptorial birds. *J. Avian Med. Sur.*, 11: 77-92.
- Van der Bogaard AE, Stobbering EE. (2000). Epidemiology of resistance to antibiotics. Links between animals and humans. *Int. J. Antimicrob Agents*, 14: 327-35.

Microbiología clínica en fauna salvaje

José Esteban García de los Ríos, Pedro Antonio Jiménez Gómez,
María Paloma Reche Sainz e Irene Rodríguez González

Sección de Microbiología. Facultad de Ciencias Experimentales y de la Salud,
Universidad San Pablo CEU, Ctra. Boadilla del Monte km. 5,3. 28668 Boadilla del Monte, Madrid.

E-mail: jgarios@ceu.es

Los Centros de Recuperación y Hospitales de Fauna Salvaje son entidades, generalmente promovidas por ONGs, que desempeñan un importante papel en el mantenimiento de la biodiversidad. Estos Centros reciben actualmente un gran número de pacientes de muy diversas especies, predominando en el interior de la Península Ibérica las pertenecientes a las rapaces. De esta forma, en los últimos años hemos podido aprender mucho sobre las patologías, los métodos de diagnóstico y tratamiento de las enfermedades de la fauna salvaje. Para llegar a estos resultados es necesario una aproximación multidisciplinar a nuestros estudios en los que se conjugan las aportaciones de los veterinarios, etólogos, anatomopatólogos y, por supuesto, microbiólogos.

Las dificultades que nos encontramos a la hora de intervenir en la fauna salvaje, si las compramos con la clínica humana, son variadas. En primer lugar, el número de especies que se reciben es elevado, presentando importantes diferencias fisiológicas, anatómicas y funcionales, lo que complica el diagnóstico, la interpretación de los resultados, el tratamiento y la evolución del paciente. En segundo lugar, la mayoría de los animales salvajes, como mecanismo de supervivencia, no presentan signos clínicos hasta que están gravemente enfermos y, además, estos síntomas son muy vagos y comunes a muchas enfermedades muy diferentes. La ausencia de síntomas o su inespecificidad hacen el diagnóstico muy complicado. Una última dificultad es la que supone el manejo del paciente para el examen físico, toma de muestras, diagnóstico, tratamiento y rehabilitación. La mayoría de los pacientes, incluidos los que toleran la presencia humana, no están acostumbrados al manejo, por lo que requieren medios especiales.

La ley 4/1989 de Conservación de los Espacios Naturales y de la Flora y Fauna Silvestres establece, en su artículo 26 (apartado 4), que quedan prohibidos la captura, posesión, tráfico y comercio de ejemplares, vivos o muertos, de animales silvestres, especialmente los incluidos en el Catálogo Nacional de Especies Amenazadas. Debido a esta ley, la única fuente de muestras en fauna salvaje son los Centros de Recuperación y Hospitales de Fauna Salvaje. A nuestro laboratorio llegan habitualmente tres tipos de muestras microbiológicas. En primer lugar, las que proceden de casos clíni-

cos de animales atendidos en el Hospital. En segundo lugar, los órganos procedentes de necropsias de animales que llegan muertos al Centro. Por último, muestras procedentes de los programas de cría que desarrollan las diferentes Organizaciones. En este caso, son huevos abortados por motivos desconocidos y muestras para el control de patógenos. En los tres tipos de muestras destacan mayoritariamente los aislamientos de Gram-negativas y, sobre todo, *Enterobacteriaceae*. Las especies detectadas han sido muchas, por lo que pasaremos a tratar de las más representativas.

Las cepas de *E. coli* patógenas en humanos que, a veces, se pueden asociar a animales son las Enteropatógenas (EPEC), Enterotoxigénicas (ETEC), Enteroinvasivas (EIEC), Enterohemorrágicas (EHEC), Enteroagregativas (EaggEC), Uropatógenas (UPEC) y las de Meningitis Neonatal (NMEC). Algunas de éstas han sido aisladas de animales salvajes, como es el caso de las EHEC en ciervos de varios países, o las UPEC, en colibacilosis en avifauna salvaje (O2 K1 y O1 K1 coinciden en el antígeno somático), lo cual es lógico, puesto que al ser eliminados por la orina, estarán presentes en aguas y otros lugares relacionados con la contaminación. Las cepas NMEC se caracterizan por la posesión del antígeno capsular K1, un polisacárido química y antigénicamente idéntico al polisacárido B de *Neisseria meningitidis*. Este polisacárido lo presentan algunos aislados en avifauna salvaje (O2 K1 y O1 K1, coinciden en el antígeno capsular). Cuando *E. coli* actúa como parásito intestinal, tiene genes de virulencia que le facilitan esa forma de vida, induciendo y descubriendo las adhesinas correspondientes. Por el contrario, cuando la infección es sistémica, caso que nos encontramos con más frecuencia en fauna salvaje, *E. coli* induce la producción de su polisacárido capsular que, con su poder antifagocitario, le mantiene más protegido de la fagocitosis en sangre o en los tejidos. De ahí la coincidencia de la presencia del antígeno K1 en las cepas NMEC y alguno de los aislados en avifauna salvaje.

A las cepas citadas como patógenas en humanos, hay que añadir el grupo de las denominadas APEC (*Avian Pathogenic E. coli*), patógenas en aves de consumo, en las que causan aerosaculitis, poliserositis y otras afecciones extraintestinales. Son



Dos buhos del Hospital de Fauna Salvaje de GREFA (Foto: Jordi Colás)

cepas productoras de fimbrias F1 y de aerobactina, sideróforo relacionado con la infección sistémica. En nuestras muestras procedentes de aves salvajes nos hemos encontrado serotipos de APEC ya descritos en aves de abasto y otros no tipables, lo que implicaría su pertenencia a serotipos nuevos. En los casos clínicos de colibacilosis sistémica, las cepas aisladas eran productoras de aerobactina. En estos casos, ante el aislamiento de *E. coli* en varios órganos, se plantea la comprobación de si las cepas aisladas son la misma y si se trata de una cepa capaz de desencadenar una septicemia. Para comprobar los diagnósticos hemos empleado la ribotipificación con sonda usando como enzimas *ClaI* y *MluI*. Tanto la *ClaI*-ribotipificación como la *MluI*-ribotipificación resultaron buenas herramientas para discriminar entre cepas de *E. coli* en diferentes casos clínicos. Para establecer el carácter invasivo, la duración de la enfermedad y las lesiones en los órganos recurrimos a un modelo animal en pollos de gallina.

La incidencia de *Salmonella* en fauna salvaje es mas baja, si la comparamos con *E. coli*. El porcentaje de aislamientos en rapaces de vida libre ha sido inferior al 5% en los últimos años. En el caso de rapaces algunos años en cautividad hemos obtenido números superiores, pero se trata de casos de diseminación de un brote. En aves no rapaces de vida libre encontramos prevalencia superior al 11%, y mayor al 7% en las cautivas, aunque no se puede sacar ninguna conclusión de estas cifras, por ser muestras con números muy diferentes y coincidir también con algunos brotes. Todos nuestros aislados han sido caracterizados como *Salmonella enterica* subsp. *enterica*, aunque pertenecientes a diferentes serotipos y fagotipos. En general, el serotipo y el fagotipo siguen siendo los marcadores epidemiológicos eficaces en

Salmonella, aunque, cuando se trata de brotes concretos, hemos tenido que recurrir a métodos de tipificación genéticos. En un brote de *Salmonella* serotipo Havana, que afectó a varias especies de animales residentes en el Hospital de Fauna Salvaje de GREFA, recurrimos a AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*). En brotes de *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium DT160 que aislamos asociados a mortandad de gorriones hubo que recurrir a ribotipificación, IS200-tipificación y electroforesis en campo pulsado para resolverlos adecuadamente.

Entre otros casos, debidos a otras *Enterobacteriaceae*, podemos citar algunos particularmente interesantes: En primer lugar, dos casos de septicemia por *Yersinia pseudotuberculosis*, un cernícalo común y un pollo de buitre, que serán las primeras descripciones de pseudotuberculosis en rapaces. En segundo lugar, varios casos, no relacionados entre sí, de rapaces y no rapaces con septicemia por *Serratia marcescens*. Y, por último, diferentes casos clínicos con afecciones renales fatales, producidas por *Klebsiella pneumoniae*, en azor, ardilla, búho chico y gaviota reidora.

Una segunda familia importante que se aísla en fauna salvaje es *Chlamydiaceae*. Anteriormente constaba de un único género, *Chlamydia*, que se ha dividido en dos géneros, *Chlamydia* y *Chlamydophila*. Se han añadido dos nuevas especies, *Chlamydia muridarum* y *Chlamydia suis* que, junto con *Chlamydia trachomatis*, constituyen el género *Chlamydia*. El nuevo género, *Chlamydophila*, incorpora las especies *Chlamydia pecorum*, *Chlamydia pneumoniae* y *Chlamydia psittaci*, para dar lugar a *Chlamydophila pecorum*, *Chlamydophila pneumoniae* y *Chlamydophila psittaci*. Por último, aparecen tres nuevas especies derivadas de *Chlamydia psittaci*: *Chlamydophila abortus*, *Chlamydophila caviae* y *Chlamydophila felis*.

Chlamydophila psittaci se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza, pudiéndose aislar a partir de un gran número de animales. Esta especie es especialmente contagiosa, agente de la psitacosis u ornitosis característica de las aves. La información acerca de la prevalencia de la infección por clamidia en aves salvajes es muy reducida, existiendo muy pocas investigaciones a este respecto, aunque parece que su incidencia, especialmente en rapaces, es muy baja. Las aves infectadas pueden liberar el agente infeccioso a través de las heces, orina, exudados respiratorios y oculares, produciéndose la dispersión del mismo a través de las corrientes de aire. La ingestión de la bacteria conlleva a la infección de las células epiteliales. También puede haber transmisión ver-

tical que produciría la infección del huevo. Sin embargo, existen marcadas diferencias en la susceptibilidad del huésped dependiendo de la especie del mismo, así como también de la edad del individuo siendo los más jóvenes los que son más susceptibles a la bacteria, que puede desencadenar, en muchos casos, la muerte de los mismos. Los signos clínicos más característicos son un debilitamiento en el plumaje, hipotermia, letargia disnea y deshidratación. Existe también el estado subclínico, característico de las especies con una reducida susceptibilidad o de aquellas infectadas con una cepa de virulencia moderada, apareciendo diarrea y conjuntivitis principalmente. En el estado asintomático, el animal puede eliminar el agente infeccioso a través de las materias fecales. Por tanto, se ha de considerar la posible transmisión del agente infeccioso en aves en cautividad, ya que la existencia de una sola ave infectada por esta bacteria es suficiente para que todas las demás se encuentren expuestas al agente infeccioso, aunque esto no implique que desarrollen la infección. Las infecciones con psitacosis, linfogranuloma venéreo y tracoma constituyen la quinta causa de las infecciones bacterianas asociadas a laboratorio. El contacto y exposición a aerosoles infecciosos en el manejo, cuidado o necropsias de aves infectadas son la principal fuente de psitacosis asociada a laboratorio. Las clamidias se pueden encontrar en tejidos, heces, secreciones nasales y sangre de los animales infectados. Se recomiendan las precauciones propias de un Nivel 2 de Biopeligrosidad. Por esta razón, mientras no dispongamos de los medios adecuados, nos estamos limitando a la simple detección de la presencia de estos microorganismos.

Uno de los métodos que nos permite un diagnóstico rápido de *Chlamydia* en animales tanto sintomáticos como asintomáticos es la realización de un ELFA (*Enzyme Linked Fluorescent Assay*) automático mediante el MiniVIDAS de BioMérieux. Actualmente estamos tratando de optimizar un protocolo para la extracción y detección mediante PCR. Con las limitaciones anteriormente expuestas, sin llegar a obtener resultados que determinen el alcance global de estos microorganismos, nuestros resultados apuntan a la presencia de clamidia en poblaciones de aves salvajes en la naturaleza, siendo causa directa de abortos e inviabilidad de pollos.

Algunos países emplean más de la mitad de su producción de compuestos antimicrobianos en el sector agroalimentario (ganadería, pesca y producción vegetal), usándose la mayor parte en el ganado para estimular el crecimiento. La administración de antibióticos a los animales puede pro-



José Esteban García de los Ríos (2º por la izq.) es Doctor en Biología por la Universidad Complutense de Madrid. Profesor de Microbiología, actualmente es Director de la Sección de Microbiología en la Facultad de CC Experimentales y de la Salud, Universidad San Pablo CEU de Madrid. Ha trabajado en el campo de la Fitopatología sobre *Pseudomonas savastanoi* y el complejo *Erwinia herbicola-Enterobacter agglomerans*. En los últimos años su trabajo se ha centrado en la Microbiología Clínica en Fauna Salvaje, en colaboración con diversos Centros de Recuperación y Hospitales de Fauna Salvaje. Pertenece a la Wildlife Disease Association. El Grupo de Investigación que dirige, trabaja en Proyectos Relacionados con la Resistencia a Antibióticos y Marcadores Moleculares en Bacterias de origen Clínico y Animal.

Pedro Antonio Jiménez Gómez (3º por la izq.) es Doctor en Biología por la Universidad San Pablo CEU de Madrid, Profesor de Microbiología en la Facultad de CC Experimentales y de la Salud. Actualmente es Coordinador de Microbiología del Hospital de Fauna Salvaje de GREFA y de otros Centros de Recuperación. Su trabajo de tesis se tituló Estudio de Diversos Grupos Bacterianos con Relevancia Clínica en Hospitales de Fauna Salvaje.

María Paloma Reche Sainz (4ª por la izq.) es Doctora en Farmacia por la Universidad San Pablo CEU de Madrid y Profesora de Microbiología en la Facultad de CC Experimentales y de la Salud. Beca Erasmus en el *Centre Hospitalier Regional de Nantes* (Francia), donde desarrolló su Tesina de Licenciatura "Étude bactériologique et épidémiologique des souches de *E. coli* productrices de bêta-lactamases du type TRI". Su trabajo de tesis se tituló Estudio Epidemiológico de aislados de *Salmonella* spp. procedentes de aves salvajes. Pertenece a la Raptor Research Foundation.

Irene Rodríguez González (1ª por la izq.) es Licenciada en Farmacia por la Universidad San Pablo CEU de Madrid, su trabajo de investigación sobre el que está haciendo el doctorado es Integrones de Clase I en *Enterobacteriaceae* de origen humano y animal.

ducir la selección de bacterias resistentes a los antibióticos en la población animal que después puede extenderse a los humanos a través de la

cadena alimentaria. Esta situación ha llevado a un serio aumento y diseminación de bacterias multirresistentes, no sólo entre las patógenas, sino también entre las bacterias comensales, constituyendo un reservorio de genes de resistencia para las patógenas. La fauna salvaje no se encuentra aislada de la cadena alimentaria, por lo que muchos de los fenómenos observables en ganadería y en clínica humana los estamos observando en estos animales. De forma rutinaria, todos los aislamientos que proceden de casos clínicos, son sometidos a antibiograma, no solo para establecer los posibles tratamientos, sino también para estudiar las resistencias en aquellos casos en los que sus fenotipos nos indican que pueden ser de interés. El estudio de cepas resistentes lo hemos limitado, por razones prácticas, a las *Enterobacteriaceae* y entre los antibióticos, hemos empezado centrándonos en el estudio de algunos de los que se emplean en veterinaria y ganadería, β -lactámicos y quinolonas, aunque actualmente estamos ampliando la investigación a integrones portadores de multirresistencia.

Las principales resistencias a quinolonas se deben a mutaciones en la DNA-girasa y en la topoisomerasa IV. Una vez constatado el fenotipo de resistencia mediante antibiogramas por difusión y determinación de la CMI, detectamos el genotipo de resistencia, buscando las mutaciones en las subunidades de ambas enzimas. Para ello amplificamos y secuenciamos las regiones determinantes de la resistencia a quinolonas, buscando mutaciones en los genes *gyrA* y *gyrB*. En la topoisomerasa IV, buscamos las mutaciones en el gen *parC* y en el *parE*. En la actualidad, tenemos aislados, secuenciados y depositados en el *Gene Bank* de la NCBI, 44 genes de resistencia de *Salmonella* y *E. coli*, y hemos enviado para su publicación algunos trabajos. La principal mutación de resistencia que hemos encontrado en *E. coli* ha sido en *gyrA*, en la región determinante de resistencia a quinolonas (QRDR), que supone un cambio de la serina en posición 83 por una leucina, como se detecta en clínica humana. Se trata de un cambio tan pequeño, que no afecta a la actividad de la enzima, lo que nos explicaría su persistencia en el medio ambiente.

La resistencia a β -lactámicos en *Enterobacteriaceae* se debe principalmente a la producción de β -lactamasas, por lo que nos hemos centrado en el aislamiento y caracterización de estas enzimas en nuestros aislamientos. Entre las β -lactamasas detectadas a partir de cepas procedentes de fauna salvaje, podemos dar algunos datos: El 60% de los aislados de *E. coli* con β -lactamasas, la enzima detectada era AmpC y, en un caso, una cepa

hiperproductora. También detectamos AmpC en *Serratia marcescens*, *Enterobacter cloacae*, *Morganella morganii* y *Citrobacter freundii*. Entre las β -lactamasas plasmídicas, destaca, no sólo en *E. coli*, la presencia de TEM1, en algunos casos simultáneamente con AmpC, e hiperproducción de TEM1 con resistencia a los inhibidores. En *Salmonella* hemos detectado TEM1 y TEM2. Finalmente, en casi todas las cepas de *Klebsiella pneumoniae*, hemos detectado β -lactamasas cromosómicas tipo SHV1.

Desde que se estudió el transposón Tn21, muchos fenotipos de multirresistencia se han asociado a integrones. La evolución y diseminación de las bacterias portadoras de estas estructuras, así como de los genes de resistencia es uno de los aspectos importantes que estamos desarrollando. En ese sentido, en nuestros estudios preliminares, ya hemos podido constatar la existencia de integrones de clase I en aislados de origen humano y animal, no descritos en la bibliografía.

Finalmente, queremos destacar que estos trabajos que venimos desarrollando, no son solamente investigación básica para incrementar nuestro conocimiento microbiológico. También suponen un apoyo, aún no podemos valorar su cuantía, al mejor conocimiento y a la conservación de nuestras especies salvajes. De hecho, la demanda de análisis microbiológico por parte de los Centros de Recuperación se ha incrementado notablemente en los últimos años, y cada vez son más las Organizaciones, procedentes de distintas Comunidades Autónomas, que acuden a nosotros.

Agradecimientos

Estos trabajos se llevan a cabo gracias al Proyecto de Investigación "Aplicación de nuevas técnicas moleculares al estudio de la microbiota normal y patógena de origen humano y animal", Proyecto 13/99 de la Facultad de Ciencias Experimentales y de la Salud, Universidad San Pablo CEU de Madrid.

Agradecemos la colaboración de los Centros de Recuperación y Hospitales de Fauna Salvaje: GREFA (Grupo para la Recuperación de la Fauna Autóctona y su Hábitat), AMUS (Asociación por el Mundo Salvaje), Brinzal y DEMA (Grupo de Defensa Medioambiental), Delegación Provincial de Cádiz de la Consejería de Medio Ambiente de Andalucía, CRAS-Zoológico de Jerez, Esparvel de Toledo, C. Rodríguez de la Estación Biológica de Doñana y J. Compañ de la Delegación de Medio Ambiente del Ayuntamiento de Colmenar Viejo (Madrid)

Al Dr A. Ramis, del Servei de Diagnòstic de Patologia Veterinària, Facultat de Veterinària de la

Universitat Autònoma de Barcelona.

Por último, nuestro reconocimiento a la ayuda prestada en el serotipado a los Doctores M.A. Usera y A. Echeíta, de la Sección de Enterobacterias en el Servicio de Bacteriología del Centro Nacional de Microbiología, y al Dr J. Blanco, Laboratorio de Referencia de *E. coli*, Facultad de Veterinaria, Universidad de Santiago de Compostela, Lugo.

Bibliografía

- Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. (1995). A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 39: 1211-1233.
- Cambau E, Gutmann L. (1993). Mechanisms of resistance to quinolones. *Drugs*, 45: 15-23.
- Goldstein C, Lee MD, Sánchez S, Hudson C, Phillips B, Register B, Grady M, Liebert C, Summers AO, White DG, Maurer JJ. (2001). Incidence of Class 1 and 2 Integrases in Clinical and Commensal Bacteria from Livestock, Companion Animals, and Exotics, *Antimicrob. Agents Chemother.* 45: 723-726.
- Livermore DM. (1995). β -lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin. Microbiol. Rev.*, 8: 557-584.
- Morishita TY, Aye PP, Brooks DL. (1997). A survey of diseases of raptorial birds. *J. Avian Med. Sur.*, 11: 77-92.
- Van der Bogaard AE, Stobbering EE. (2000). Epidemiology of resistance to antibiotics. Links between animals and humans. *Int. J. Antimicrob Agents*, 14: 327-35.

El rincón de la lengua

por Ricardo Guerrero y Mercè Piqueras, de la revista INTERNATIONAL MICROBIOLOGY

LA METROLOGÍA Y EL SISTEMA INTERNACIONAL DE UNIDADES

Hace un año hablamos en esta sección de los "falsos amigos y otras contradicciones". Durante este tiempo, los "dramáticos" (por espectacular, intenso, drástico, etc.), los "actualmente" (cuando se quiere decir "de hecho") y los "billones" (cuando son en realidad miles de millones) han seguido poblando las páginas de los artículos que leemos en castellano, o las diversas páginas que encontramos en Internet. A veces, evitarlo es sólo cuestión de consultar un diccionario. Pero en un diccionario habitual no se encuentran muchos términos científicos ni muchas unidades de uso frecuente en nuestros artículos; es necesario utilizar diccionarios científico-técnicos. Como prometimos en la entrega anterior (*Actualidad SEM*, junio 2001), al final de este artículo mencionamos un buen libro* que nos permitirá solucionar muchos problemas. No dudemos en echar mano de él con frecuencia.

Toda ciencia experimental se basa en la observación de las propiedades de las entidades objeto de estudio. Cuando esas propiedades pueden medirse, se denominan **magnitudes**. Las magnitudes que pueden tener un valor cualquiera de los comprendidos dentro de un conjunto se denominan **variables**. Actualmente existe una tendencia a denominar parámetro a cualquier magnitud o variable. Sin embargo, debería evitarse ese uso inadecuado de un término matemático que designa a la variable que, en una familia de elementos, sirve para identificar a cada uno de ellos mediante su valor numérico. Referirse a la temperatura, a la salinidad, a la presión o al potencial de oxidoreducción (u óxido-reducción, o redox) como "parámetros" ambientales es, por tanto, inadecuado.

Historia

La ciencia que estudia las medidas es la **metrología**. Para medir cualquier magnitud es necesario disponer de una unidad. A lo largo de la historia se han desarrollado numerosas unidades de medida, que se definían de manera empírica y sin que existiese entre ellas ninguna relación matemática. Es famoso el caso de la yarda: según la leyenda, cuando algunos súbditos de Enrique I de Inglaterra (1100-1135) le pidieron que les diera

una unidad de longitud, éste respondió señalando la distancia que había entre su nariz y la punta de sus dedos con el brazo extendido. Aunque este origen es seguramente ficticio, hay unidades muy antiguas que han llegado hasta nuestros días. Por ejemplo la libra o la onza, que eran medidas romanas, pero que han tenido valores diferentes de los actuales y variables según donde se han usado. Así, la libra romana equivalía a 0,32745 kilogramos, mientras que la libra de Castilla era 0,460093 kilogramos, la de Gerona 0,400 kilogramos y la inglesa actual 0,454 kg.

El primer conjunto de unidades que formó un sistema integrado fue el **sistema métrico decimal**, creado en Francia a finales del siglo XVIII. El 22 de junio de 1799 se depositaban en los Archivos de la República, en París, las dos piezas de platino iridiado que eran la medida estándar para el metro y el kilogramo. En 1874 se introdujo el **sistema cegesimal (CGS)**, basado en el centímetro, el gramo y el segundo. En 1875 se adoptaron nuevos prototipos que tomaron el metro y el kilogramo como unidades básicas de longitud y masa. En 1901 el físico e ingeniero italiano Giovanni Giorgi propuso el llamado **sistema MKS** (o **MKSA**), conocido también como **sistema Giorgi**, que se basaba en el sistema métrico decimal, pero combinaba unidades mecánicas con unidades eléctricas. A partir del MKS se originó el **Système International d'Unités (SI)**. El SI fue adoptado y recomendado por el 11º Congreso General de Pesos y Medidas en 1960. Estos congresos se celebran cada cuatro años en París y participan en él los representantes de los estados integrados en la Oficina Internacional de Pesos y Medidas (BIPM), con sede en la capital francesa. Su uso internacional permite disponer de un sistema de unidades de medida común a todos los campos de la ciencia y de la tecnología. Debe advertirse que las siglas del Sistema Internacional deben escribirse siempre así, SI, aunque el texto esté en inglés, ya que son las iniciales inalterables del nombre original en francés.

Unidades básicas y derivadas

Componen el SI dos clases de unidades de medida: las **básicas** o **fundamentales** y las derivadas. Hay siete unidades básicas, que son independientes entre sí, según se estableció por convenio (Tabla 1).

Tabla 1. Unidades básicas.

Magnitud	Símbolo	Unidad SI	Símbolo
Cantidad de sustancia	n	mol	mol
Intensidad de corriente eléctrica	I, i	ampère	A
Intensidad luminosa	Iv	candela	cd
Longitud	L, l	metro	m
Masa	m	kilogramo	kg
Temperatura termodinámica	T	kelvin	K
Tiempo	t	segundo	s

Las unidades derivadas se forman combinando unidades básicas, según relaciones algebraicas que se establecen entre ellas (mediante multiplicaciones o divisiones). Las unidades de medida y sus símbolos se escriben siempre en letra redonda (no en cursiva), independientemente del tipo de letra empleado en el texto donde aparezcan, y los símbolos no llevan ningún punto detrás (a no ser que les corresponda gramaticalmente, por ser el final de una frase). Desde 1960, el SI ha evolucionado para satisfacer nuevas necesidades de medida y han surgido nuevas unidades derivadas.

El mencionado Congreso General de Pesos y Medidas de 1960 también aceptó otras unidades que, sin pertenecer al SI, son de uso habitual en muchos países. Por ejemplo, el **litro**, que no pertenece al SI, substituye al **metro cúbico**, que es la unidad de volumen propia del SI, en varias magnitudes derivadas de uso muy frecuente. El símbolo del litro es L o l (es recomendable usar L para evitar que la *le* minúscula se confunda con el número 1). Un ejemplo de unidad usada con frecuencia y que tampoco pertenece al SI es el **ángstrom** (Å), que se emplea cuando se habla de la medida de átomos o moléculas. Es recomendable substituir el ángstrom por la unidad del SI que tiene un valor más cercano: el **nanómetro**, cuyo símbolo es **nm** (1 nm = 10 Å).

Múltiplos y submúltiplos

El SI admite el uso de **múltiplos** y **submúltiplos** para evitar usar números muy grandes o muy pequeños de las unidades de medida. Los múltiplos y los submúltiplos se indican mediante prefijos que acompañan a los símbolos de las unidades SI (Tabla 2). Es aconsejable usarlos con el nombre completo de la unidad correspondiente; por tanto, no escribiremos **kilos**, **micras** o **megas**, para referirnos a **kilogramos**, **micrómetros** o **megabites**.

Normas prácticas para el uso de unidades

- Los símbolos que representan unidades derivadas de nombres propios se escriben con la letra inicial mayúscula (ejemplos: Ci, curie; A, ampère. Siempre se escriben con letra romana, excepto el ohm, cuyo símbolo es Ω . Una excepción es litro, L, ya que ningún científico se ha llamado así, todavía.

- Los símbolos de las unidades no varían en plural y sólo van seguidos de punto cuando se encuentran al final de una frase (ejemplos: 1 kg; 30 s).

- El símbolo de la unidad sigue al símbolo del prefijo sin espacio (ejemplos: km, fg). El número que acompaña a la unidad debe ir separado de ésta por un espacio (1 kg, 30 s), aunque los ingleses tradicionalmente suelen escribirlos juntos.

- El producto de dos o más unidades se indica preferentemente usando un punto volado como signo de multiplicar (ejemplos: coulomb, s·A; lumen, cd·sr), o escribiendo los símbolos de las diferentes unidades uno detrás de otro, sin separación (sA, cdsr). En este último caso, hay que evitar colocar delante una unidad que tenga el mismo símbolo que un prefijo, porque podría causar confusión (por ejemplo, Nm -newton por metro- y no mN, que es milinewton).

- El cociente de dos o más unidades puede indicarse mediante un cociente normal, mediante la barra inclinada (evitando que el denominador contenga un producto) o mediante potencias negativas (ejemplos: 30 g/L; 30 gL⁻¹).

- Los nombres de las unidades se escriben siempre con minúsculas (ejemplos: gramo, ampère, segundo).

- Los nombres de las unidades siguen las reglas gramaticales para el plural (ejemplos: gramos, ampères, segundos).

Tabla 2. Múltiplos y submúltiplos en el SI.

Múltiplos			Submúltiplos		
Prefijo	Símbolo	Factor	Prefijo	Símbolo	Factor
yotta-	Y	10 ²⁴	yocto-	y	10 ⁻²⁴
zetta-	Z	10 ²¹	zepto	z	10 ⁻²¹
exa-	E	10 ¹⁸	atto-	a	10 ⁻¹⁸
peta-	P	10 ¹⁵	femto-	f	10 ⁻¹⁵
tera-	T	10 ¹²	pico-	p	10 ⁻¹²
giga-	G	10 ⁹	nano-	n	10 ⁻⁹
mega-	M	10 ⁶	micro-	μ	10 ⁻⁶
kilo-	k	10 ³	mili-	m	10 ⁻³
hecto-	h	10 ²	centi-	c	10 ⁻²
deca-	da	10 ¹	deci-	d	10 ⁻¹

- En cálculos de termodinámica y en estudios de cinética, la temperatura debería expresarse en kelvin (K), que es la la unidad del SI (es incorrecto referirse a esta unidad como "grados kelvin"), aunque es aceptable expresar la temperatura de un experimento en grados Celsius ($^{\circ}\text{C}$), que es la escala que utilizamos habitualmente en biología. Es un error frecuente denominar "grados centígrados" a los grados Celsius, o escribir el "cero volado" delante de la K. Por tanto, deberíamos escribir, por ejemplo, 10°C . equivalen a 283,16 K.

- Según el BIPM antes mencionado, los nombres de las unidades que proceden de un nombre de persona deben escribirse con la misma ortografía que el nombre correspondiente, pero con minúscula inicial (ejemplos: ohm, ampère, joule, coulomb). Por tanto, no es conveniente "castellanizarlos" (ohmio, amperio, julio, culombio).

- El BIPM tiene comités que velan por el buen uso y actualización de las unidades científicas. En caso de duda, debe recurrirse a las personas o entidades adecuadas. Existen todavía muchos desacuerdos o inconsistencias en el uso de los

conceptos o terminología científicos. Uno de ellos es la expresión de los decimales. El acuerdo general es que debe hacerse con una coma ortográfica escrita abajo (como hacemos tradicionalmente en España). No obstante, en la inmensa mayoría de los artículos y revistas se sigue la costumbre anglosajona: punto abajo. Mientras no se uniformice la expresión habrá que tener cuidado con frases como la siguiente: "la densidad del agua destilada a 4°C es 1,000." La frase tendría sentido en castellano, o en francés, pero causaría asombro si la escribiéramos en una revista internacional (en inglés, ese número es mil), sin cambiarlo por 1.000 (y ahora nos toca a nosotros sorprendernos).

* Aunque existen varios diccionarios científico-técnicos en español, el mejor sin duda es el "**Vocabulario Científico y Técnico**" de la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. 3^a ed. Editorial Espasa Calpe. Madrid, 1996. 1628 pp.