

Temas de actualidad

Paul Nurse y el Laboratorio de Ciclo Celular

Mercedes Pardo Calvo

Cell Cycle Laboratory. Imperial Cancer Research Fund. Londres, Reino Unido

E-mail: M.Pardo@icrf.icnet.uk

El premio Nobel de Medicina y Fisiología 2001 ha sido concedido a los Drs. Leland Hartwell, Paul Nurse y Tim Hunt por sus descubrimientos de los reguladores clave del ciclo celular, es decir, del mecanismo que controla la división celular.

Hartwell, director del Fred Hutchison Cancer Research Centre (Seattle), estableció las bases para el uso de levaduras como organismos modelo en el estudio del ciclo celular, realizando los primeros experimentos en los que empleó la levadura de panadería *Saccharomyces cerevisiae*. Descubrió un gen al que denominó *CDC28*, que constituye uno de los puntos de control del ciclo en este organismo, regulando la entrada en el siguiente ciclo celular. Utilizando la llamada levadura de fisión, *Schizosaccharomyces pombe*, Paul Nurse identificó el gen *cdc2*, que codifica una proteína quinasa esencial para la progresión del ciclo celular. Pero no sólo esto. Durante años la investigación en organismos modelo fue puesta en entredicho. Nurse descubrió asimismo que existía un gen humano homólogo a *cdc2*, y demostró que era capaz de complementar el defecto ocasionado por la falta de *cdc2* en la levadura. Cdc2/CDK (quinasa dependiente de ciclina) era por tanto una proteína clave para la progresión del ciclo celular. Además Paul identificó varias proteínas más que controlan la velocidad y coordinación del ciclo celular. El trabajo de Paul Nurse no sólo identificó el mecanismo básico de regulación del ciclo celular, sino que además estableció que éste es común a todos los organismos eucariotas, desde la levadura al hombre. Por su parte, Tim Hunt, trabajando en otro organismo modelo, los huevos de erizo de mar, descubrió otras moléculas de vital importancia, unas proteínas cuyos niveles varían a lo largo del ciclo celular, por lo que las denominó ciclinas. La importancia de este descubrimiento radica en que las ciclinas son necesarias para la actividad de la CDK, y por tanto son reguladores clave del ciclo celular.

Paul Nurse es Director General del Imperial Cancer Research Fund (Londres), una institución benéfica dedicada a la investigación sobre el cáncer, además de llevar su propio grupo de investigación en el Laboratorio de Ciclo Celular, en el

citado instituto. Aquí es donde actualmente estoy realizando una estancia post-doctoral. La noticia del premio Nobel no nos sorprendió a ninguno en el laboratorio. De hecho, el año pasado a mediados de Octubre nos pasábamos el día “enganchados” a Internet en la página oficial de los Nobel, ansiosos por ver aparecer su nombre. Paradójicamente, este año se nos había olvidado...

S. pombe como organismo modelo.

El laboratorio de Ciclo Celular trabaja en dos líneas de investigación claramente diferenciadas, pero a su vez íntimamente relacionadas: ciclo celular y morfología. Los objetivos principales son identificar los controles espaciales y temporales que operan en el ciclo celular eucariota, y elucidar su mecanismo molecular. Para ello se emplea como organismo modelo *S. pombe*, por su fácil manipulación genética, así como su similitud con células eucariotas superiores.

La levadura de fisión es un organismo unicelular eucariota. Presenta una morfología cilíndrica, mide de 8 a 15 μm , y mantiene un diámetro constante de 3-4 μm a lo largo del ciclo celular, de manera que el crecimiento se produce principalmente como consecuencia del alargamiento de las células por los extremos en una línea recta, de forma extremadamente polarizada. Además las células sufren varias transiciones morfológicas a lo largo del ciclo celular. Inmediatamente después de la división celular la célula comienza creciendo de forma monopolar únicamente por el extremo antiguo, es decir, el existente antes de la división. Cuando la célula alcanza un tamaño determinado, empieza a crecer también por el extremo formado tras la división, estableciéndose así un crecimiento bipolar. A este proceso se le ha denominado NETO (*New End Take Off*). El crecimiento se interrumpe durante la división nuclear, e inmediatamente después de ésta se produce la formación de un septo en el centro de la célula, que provoca la división celular por fisión binaria (de ahí el nombre de levadura de fisión), dando lugar a dos células hijas exactamente iguales. Estas transiciones

Mercedes Pardo es Licenciada y Doctora en Farmacia por la Universidad Complutense de Madrid (2000). Realizó su Tesis Doctoral sobre Biología Molecular de *Saccharomyces cerevisiae* en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Farmacia (UCM), bajo la dirección de los Dres. César Nombela y Concepción Gil.



Durante su periodo predoctoral trabajó también en el laboratorio del Dr. H. Bussey (Department of Biology, McGill University, Montreal, Canadá), sobre la pared celular de levaduras, y en el laboratorio del Dr. W. Blackstock (Cell Mapping Project, Medicines Research Centre, GlaxoWellcome, Stevenage, Reino Unido), en el marco de una colaboración para la identificación de proteínas de pared de levaduras mediante espectrometría de masas.

Actualmente es becaria post-doctoral (Fundación Ramón Areces) en el laboratorio del Dr. Paul Nurse, trabajando en morfogénesis en la levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe*; más concretamente en la relación entre los citoesqueletos de actina y tubulina durante la citoquinesis.

cíclicas vienen acompañadas de cambios drásticos en los citoesqueletos de actina y tubulina. Debido a la regularidad de su forma, *S. pombe* constituye un sistema modelo muy atractivo para el estudio de procesos relacionados con la morfogénesis o establecimiento de la forma y polaridad.

Por otra parte, *S. pombe* resulta también un sistema modelo extremadamente útil para el estudio genético del ciclo celular. Debido a las características de su crecimiento, observando simplemente el tamaño celular, Paul Nurse aisló en los años 70 varios mutantes con defectos en la progresión del ciclo celular. Muchos de éstos son mutantes termosensibles incapaces de llevar a cabo la división celular. Si las células son incapaces de realizar la mitosis, al llegar a este punto se detiene el ciclo celular. Sin embargo, el crecimiento continúa, originándose así células extremadamente alargadas (a estos mutantes los denominó *cdc*). Por el contrario, si las células carecen de algún regulador del ciclo celular y éste se acelera, la división celular se produce de forma prematura, dando lugar a células de pequeño tamaño (estos mutantes fueron aislados en Escocia, y denominados *wee* – pequeño en escocés). Ambos tipos de células pueden ser identificadas mediante examen visual de las placas donde están creciendo. Estos mutantes permitieron la identificación de genes necesarios para la progresión del ciclo celular o su regulación. La belleza de estos

estudios es el hecho de que los aspectos básicos de la regulación del ciclo celular están muy conservados desde las levaduras a los seres humanos, y por tanto, el estudio de estos controles en organismos modelo como la levadura *S. pombe*, de fácil manipulación genética, han demostrado ser muy informativos sobre los controles análogos en células humanas, y continuarán siéndolo.

Hay que resaltar además que recientemente se ha completado también la secuenciación de su genoma, lo cual facilitará aún más los estudios en este organismo.

Ciclo celular eucariótico.

En concreto, el trabajo sobre controles temporales del ciclo celular está enfocado en tres tipos de controles: (1) la regulación del comienzo de la fase S del ciclo celular, durante la cual se produce la replicación del DNA; (2) los puntos de control que aseguran la estabilidad genómica; y (3) los controles que actúan durante la meiosis.

Dentro de la regulación de la fase S del ciclo celular, el interés del laboratorio está centrado en la proteína Cdc18. Esta proteína es esencial para el comienzo de la fase de replicación del DNA. Por otra parte, niveles elevados de la misma son capaces de inducir este proceso haciendo caso omiso de los controles que aseguran que únicamente se produzca una fase S en cada ciclo celular. El mecanismo mediante el cual Cdc18 ejerce este efecto consiste en la activación de los orígenes de replicación de forma reiterada. Cdt1 es un factor que promueve esta característica de Cdc18. Ambas proteínas se asocian físicamente, y son necesarias para la asociación de Cdc21, parte del complejo que recluta a la maquinaria de replicación, con la cromatina en la fase G1 previa a la síntesis de DNA. Tanto Cdc18 como Cdt1 están conservadas en metazoos y plantas, lo cual sugiere que su papel regulador del comienzo de la fase S está conservado en organismos eucariotas multicelulares.

Los puntos de control (*checkpoints*) del ciclo celular aseguran que los distintos eventos de éste ocurran de forma ordenada, con el fin de mantener la integridad genómica. Los puntos de control de la replicación del DNA y del daño del DNA impiden la segregación del material genético cuando se inhibe la replicación o cuando se producen daños en el DNA. Los mecanismos moleculares que subyacen estos controles también están conservados en todos los eucariotas. Cuando se detecta un bloqueo en la replicación del DNA o daño en el mismo, se detiene la progresión del ciclo celular justo antes de la mitosis mediante la inhibición de

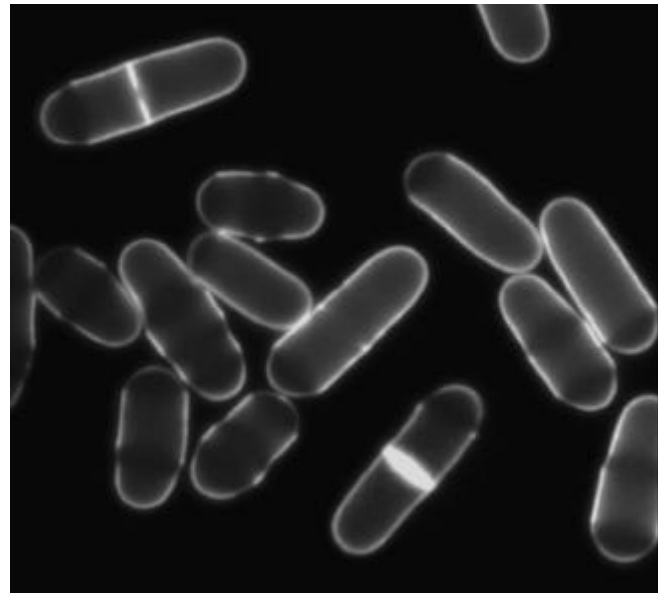
la quinasa dependiente de ciclina CDK, con el fin de dar tiempo a reparar los daños.

Los puntos de control que actúan sobre la meiosis no están tan bien caracterizados como los que operan durante el ciclo mitótico. El empleo de la levadura de fisión tiene aquí una ventaja importantísima, ya que es el único sistema eucariota en el que es posible conseguir una meiosis sincrónica. Utilizando este sistema, se ha puesto de manifiesto que durante la meiosis opera un punto de control de la replicación del DNA. Si se inhibe la fase S premeiótica, se produce una parada del ciclo celular en la meiosis I, que requiere de las proteínas Rad (que también operan en el punto de control mitótico), y de la proteína quinasa Cds1. Esta parada actúa de forma similar al punto de control mitótico análogo. Sin embargo, existe además un segundo punto de parada, durante la meiosis I, en el cual la actividad CDK es elevada y se forma el huso meiótico. Este segundo punto puede reflejar un control correspondiente a procesos específicamente relacionados con la meiosis, como la recombinación o el emparejamiento de cromosomas homólogos.

Morfogénesis en *S. pombe*.

El mantenimiento de la forma y la polaridad celular es una de las funciones básicas en Biología. Uno de los objetivos del Laboratorio de Ciclo Celular es el estudio de aspectos espaciales del ciclo celular, dirigido a la identificación de los factores responsables de la morfogénesis celular, y cómo éstos varían a lo largo del ciclo celular. Dentro del marco particular del ICRF, la utilidad de estos estudios en relación con el cáncer radica en la migración celular que se produce durante la metástasis, que requiere que las células sufran cambios de forma. Así pues, un mayor conocimiento de los factores que afectan a la morfogénesis puede ayudar a comprender mejor el control de este proceso.

Debido a la regularidad y especial morfología de la levadura de fisión, ésta ha sido empleada para la identificación de factores morfogenéticos, lo cual puede hacerse directamente mediante examen visual. Si las células pierden la capacidad de crecer en línea recta, es decir, no localizan la maquinaria de crecimiento en los extremos celulares, sino en un punto próximo a éstos, se producen células curvas. En casos extremos, si la maquinaria se aleja más de los extremos, se forma una ramificación. Por otra parte, la pérdida completa de la polaridad da lugar a un crecimiento de la célula en toda su superficie, provocando células



Tinción de la pared celular y el septo de *S. pombe* con calcoflúor.

redondeadas. En el laboratorio se han aislado mutantes que presentan todas estas morfologías, que han sido denominados de acuerdo a ellas: *ban* ("banana", células curvadas), *tea* (literalmente T, células ramificadas) y *orb* (células esféricas). Estos mutantes han permitido la identificación de genes necesarios para el mantenimiento de la morfología y polaridad celular.

Actualmente, en el laboratorio se está trabajando en varios de los genes *tea* y *orb*. Tea1 es una proteína que se localiza en los extremos celulares, incluso en células que crecen de forma monopolar, es decir, sólo por un extremo. Ello sugiere que Tea1 es un marcador de la geometría celular que define los extremos de la célula. Tea1 requiere de los microtúbulos para su localización, y además, en su ausencia los microtúbulos son anormalmente largos, curvándose en los extremos celulares, lo cual sugiere que la presencia de Tea1 en éstos puede ser necesaria para el reconocimiento de los mismos por los microtúbulos. En células que carecen de Tea2, una quinesina o proteína motora de microtúbulos, Tea1 no se localiza correctamente en los extremos celulares. Esto puede indicar que Tea2 es el medio de transporte de Tea1. Otro de los factores morfológicos caracterizados en el laboratorio es Tip1, cuya falta también da lugar a células ramificadas. Tip1 es una proteína de la familia CLIP-170, que se localiza en los extremos de los microtúbulos y regula su estabilidad. Así, Tip1 forma parte de un sistema que guía a los microtúbulos a lo largo del eje longitudinal de la célula, asegurando un crecimiento de las mismas en línea recta.

Trabajar en este laboratorio está resultando una experiencia muy positiva. La inquietud científica que se respira aquí crea una atmósfera de trabajo ideal, pero además el buen ambiente en el laboratorio hace que sea un placer investigar aquí. Y del jefe, ¡qué voy a decir! Paul Nurse es un científico brillantísimo, posee una mente privilegiada y una creatividad extraordinaria, además de una personalidad encantadora y arrolladora. Por último, y alguno que lo haya escuchado afirmará con la cabeza al leer esto, Paul Nurse es un gran orador, que hace que escuchar sus charlas sea una experiencia muy entretenida y didáctica. Como él suele decir, “al fin y al cabo, es sólo teatro...” (¡y quién mejor para ello que un doble casi exacto de Robin Williams!).

Referencias

1. Brunner D. y Nurse P. (2000) New concepts in fission yeast morphogenesis. *Phil Trans R Soc Lond B* 355:873-7
2. Hayles J. y Nurse P. (2001) A journey into space. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2(9):647-56
3. Murakami H. y Nurse P. (2000) DNA replication and damage checkpoints and meiotic cell cycle controls in the fission and budding yeast. *Biochem J* 349:1-12
4. Nurse P. (1997) Regulation of the eukaryotic cell cycle. *Eur J Cancer* 33(7):1002-4
5. Nurse P. (2000) A long twentieth century of the cell cycle and beyond. *Cell* 100(1):71-8

La "inmortalidad" procariótica y la tenacidad de la vida

Ricardo Guerrero y Mercedes Berlanga*

Departamento de Microbiología, Universidad de Barcelona, Avda. Diagonal 645, 08028 Barcelona.

E-mail: guerrero@retemail.es

*B*reve es el fruto de la juventud, no dura más que el diario intervalo de la luz del sol sobre la tierra; y cuando ha pasado la primavera de la vida, ciertamente es mejor la muerte que vivir, puesto que muchos son los males que invaden el corazón, recitaba Mimnermos, poeta elegíaco griego del s. VII a.C. Pocas cosas que han cautivado tan poderosamente la imaginación humana como la idea de vivir más tiempo. Pero, por extraño que parezca, el envejecimiento y la muerte, que son el destino último de los humanos, no eran necesarios en los albores de la vida, y no lo fueron durante cientos de millones de años. La clásica definición de un ser vivo como aquél que "nace, crece, se reproduce y muere" no puede aplicarse de la misma manera a los organismos procariotas que a los eucariotas.

En una célula procariota en división, el DNA es arrastrado por la membrana a la que está unido a medida que ésta crece, hasta que la célula se divide para formar dos células idénticas a la progenitora. Siempre que el entorno lo permita, los procariotas pueden crecer y dividirse sin envejecer. Aunque hay variaciones del modelo general, la división celular típica de las bacterias se produce por "fisión binaria" y da dos células equivalentes. La división celular de las bacterias que forman pedúnculos y yemas (p. ej. *Caulobacter*, *Hyphomicrobium*, etc.) implica la formación de una nueva célula hija más pequeña, sin que la célula "madre" pierda su propia identidad una vez completado el proceso de división. La diferencia entre estas bacterias y las "convencionales" (que en tiempos fueron llamadas "eubacterias", lo que hacía referencia sólo a aquellas que tenían una morfología bien definida), no sólo es la formación de yemas o pedúnculos, sino también la formación de una nueva pared celular a partir de un punto determinado ("crecimiento polar"), en vez de producirse por toda la célula ("crecimiento intercalar"), como lo hacen las bacterias que se reproducen por "bipartición" o fisión binaria.

Muerte celular

Una consecuencia importante del crecimiento polar de las bacterias es que las estructuras citoplasmáticas, como algunas membranas internas, no participan en el proceso de división celular, lo que permite la formación de estructuras

más complejas que las células que se dividen por fisión binaria. Algunas de las consecuencias adicionales del crecimiento polar son el envejecimiento y la muerte: (i) Envejecimiento, dado que sobre la célula madre sólo puede formarse un determinado número de yemas. Al igual que ocurre en las levaduras, donde cada yema deja una "cicatriz" sobre la superficie de la célula madre, lo que impide que se vuelva a formar otra en el mismo lugar; de esta manera, cuando toda la superficie está cubierta por esas "señales del parto", la levadura es incapaz de dividirse de nuevo. (ii) Y, como consecuencia, la mortalidad de las células. Con el crecimiento intercalar, las células, en principio, no mueren. Obviamente, como toda forma de vida, las bacterias pueden "morir" por hambre (ausencia de nutrientes), calor (alta temperatura), alta concentración de sal, desecación o deshidratación, etc.

Las líneas celulares constituyen un ejemplo de la "inmortalidad" de las células eucariotas en los animales. Las células de Henrietta Lacks (línea celular HeLa, células cancerosas de útero) cumplen ahora medio siglo. Estas células fueron aisladas por George O. Gey antes de la muerte de la paciente en el hospital de la universidad John Hopkins de Baltimore en 1951 (Gey *et al.*, 1952), y continúan en la actualidad multiplicándose en los laboratorios de todo el mundo. Antes de 1950, varios equipos de investigadores habían logrado cultivar otras células animales, pero todas las células dejaban de multiplicarse *in vitro* y morían al cabo de veinte a cincuenta divisiones. Las células tumorales de Henrietta superaron espectacularmente esa restricción biológica. Gracias al tumor de esta mujer, se descubrió que las células cancerosas se caracterizan precisamente por su capacidad de dividirse indefinidamente. Hoy en día, toneladas de células de HeLa crecen en diversos laboratorios de todo el mundo, desde luego en mucha mayor cantidad que todas las células que tenía el cuerpo de la pobre Henrietta.

En la naturaleza, la carencia de nutrientes y la exposición a otros factores abióticos adversos constituyen la norma, más que la excepción. La disponibilidad de comida para las bacterias en los océanos es sólo una fracción de miligramo por litro; en agua dulce es de 6 a 10 µg/L; en el suelo, 0,4 g/100 g). Aunque los aspectos cuantitativos sean desconocidos, es probable que las bacterias

patógenas también experimenten algún tipo de privación de nutrientes mientras colonizan el huésped -la respuesta de la bacteria a la ausencia de nutrientes también provoca una resistencia a otro tipo de estrés ambiental. Las bacterias suelen dividirse a una tasa inferior a su capacidad máxima; en aguas marinas lo hacen cada 200 días; cada 20 días en el suelo de un bosque; *Escherichia coli* tiene un tiempo de generación de 5 a 20 h en el cuerpo humano, ya que aun en el intestino, donde la concentración de alimentos se espera que sea considerable, resultan habituales las condiciones de abundancia y hambruna (*feast and famine*) y la competencia con el resto de la microbiota. De hecho, en algunas bacterias patógenas como *Yersinia enterocolitica*, la inanición es aparentemente el desencadenante de la expresión de factores de virulencia.

Estrategias de supervivencia de los microorganismos

Los microorganismos se encuentran generalmente en un medio hostil, por lo que parece razonable que hayan desarrollado estrategias de supervivencia, sistemas de defensa para hacer frente a las condiciones adversas y mecanismos de control activos que faciliten el reajuste de la célula a nuevas situaciones. El coste de mantenimiento debe reducirse al máximo y utilizarse en conservar el equilibrio osmótico, el potencial de membrana, la renovación de los componentes celulares esenciales, etc. La energía necesaria para estos cambios debe ser suministrada por el metabolismo endógeno a partir de constituyentes celulares (tales como proteínas o RNA) y polímeros de reserva. Una célula lucha hasta el final por seguir funcionando, resistiéndose a la muerte; intenta reaccionar contra las fuerzas que la destruirían. Las células microbianas alternan dos estados morfo-genéticos que constituyen una especialización funcional. Un estado "activo" de crecimiento y un estado "de espera" (*stand-by*). Estos dos estados les permite crecer cuando las condiciones son óptimas y permanecer "dormidas" a la espera de nuevas condiciones favorables. Esta alternancia está ampliamente extendida en la naturaleza y, aunque la respuesta a un ambiente adverso varía entre las especies, las estrategias utilizadas se podrían dividir en dos grandes grupos: las de las bacterias diferenciadas y las de las no diferenciadas. En el primer caso (*Bacillus*, *Myxococcus*, etc.) se produce una marcada alteración de la ultraestructura de la bacteria, con la formación de endosporas, mixosporas, cistos, etc. *Escherichia* y *Pseudomonas* serían ejemplos del segundo grupo.

En las bacterias que no forman estructuras diferenciadas, las respuestas de resistencia al estrés consisten en la reducción del tamaño, la condensación del citoplasma, la alteración de la composición de las envueltas celulares, la expresión diferencial de programas genéticos, etc.

Estrategias de supervivencia en las células no diferenciadas

En los medios acuáticos oligotróficos está ampliamente extendida la alternancia entre células en estado planctónico y las mismas células en estado béntico y sésil, formando biopelículas (*biofilms*). Una biopelícula es una asociación compleja de microorganismos, constituida por una o varias especies, unidos a una superficie y embebidos en una matriz de polímeros extracelulares de origen microbiano. La adhesión de los microorganismos desencadena la expresión de factores s, que favorecen la activación de un gran número de genes. Fenotípicamente estas células sésiles son distintas de cuando son planctónicas. La formación de la biopelícula es un fenómeno de percepción de quórum (*quorum-sensing*). Generalmente cada célula secreta pequeñas cantidades de una "molécula de comunicación" (p. ej. acilhomoserina lactona). Cuando se agrega un número suficiente de bacterias (es decir, cuando se ha alcanzado un determinado nivel de densidad poblacional), la concentración de esta sustancia en el medio aumenta, con lo que se activan diferentes genes de cada célula de la población. Cepas de *Pseudomonas aeruginosa* modificadas en el laboratorio, a las que se ha eliminado el gen de una lactona, son incapaces de formar biopelículas. Las bacterias en el interior de la biopelícula forman una comunidad funcional coordinada. De hecho, las biopelículas se asemejarían a los tejidos formados por células eucariotas en su cooperatividad, y en que están "protegidas" de las variaciones bruscas de las condiciones ambientales mediante el mantenimiento de una "homeostasis primitiva" dentro de la matriz de exopolímeros. Estos polímeros retienen la humedad y los nutrientes, y permiten la formación de microambientes dentro de la matriz, que distribuyen los organismos en función de las condiciones abióticas óptimas o permisivas imperantes.

Es importante considerar el valor de esta estrategia en la Tierra primitiva. En los primeros ecosistemas acuáticos las bacterias eran atraídas hacia los nutrientes que se concentraban de forma natural sobre las superficies. El agrupamiento, en ausencia de depredación, hacía que las bacterias estuvieran protegidas de la deshidratación, radia-

ción ultravioleta, dispersión por el movimiento del agua, etc. La selección positiva de las biopelículas en los ecosistemas actuales se pone de manifiesto por el predominio de este modo de crecimiento –células "inmovilizadas" en una matriz– en todos aquellos ecosistemas que lo permiten. Muchas células planctónicas son de pequeño tamaño ("ultramicrobacterias", de aproximadamente 0,3 μm de diámetro) y se encuentran en un estado fisiológico aletargado o "durmiente". Las mismas células en una biopelícula son mayores, y tienen una vida activa. La vida planctónica constituye fundamentalmente la forma de dispersión, y la sésil la de reproducción (Costerton *et al.*, 1995).

Mecanismos moleculares de resistencia en las células no diferenciadas

Las células procariotas no diferenciadas responden a la limitación de un determinado nutriente mediante la síntesis de sistemas de transporte de alta afinidad para ese nutriente y mediante la expresión de un transportador y la utilización de otros sistemas que sean capaces de utilizar fuentes alternativas más abundantes. Sin embargo estas respuestas suelen ser insuficientes para asegurar la supervivencia, y necesitan degradar macromoléculas intracelulares y polímeros de reserva, tales como el glucógeno o los poli-b-hidroxialcanoatos (PHA). La acumulación de polímeros podría parecer un error metabólico, porque aparta del pool celular metabolitos necesarios para el crecimiento. Pero, en realidad, lo que hace es evitar el aumento de la presión osmótica interna y desarrollar la capacidad de previsión del futuro (*time-binding*), ya que el microorganismo se anticipa a unas posibles condiciones adversas del medio. Los microorganismos acumulan diferentes sustancias cuando existe un exceso de recursos en su entorno, una cantidad superior a la que necesitaría para crecer. Posteriormente, las sustancias de reserva son "consumidas" para mantener las funciones mínimas de la célula cuando la fuente externa de energía disminuye.

Esta estrategia de previsión de las condiciones futuras podría constituir una ventaja selectiva muy importante para la evolución y el mantenimiento de la vida en la Tierra. Cuando las células crecen a tasas específicas (μ) inferiores del máximo, la cantidad de RNA presente es superior al que necesitarían para llevar a cabo los procesos metabólicos. Este exceso de la capacidad de síntesis de proteínas prepara a las células para responder de forma rápida a una situación "imprevista" de abundancia de nutrientes. De forma adicional, este RNA en exceso puede servir como polí-

mero de reserva. La renovación (*turnover*) del RNA más abundante, el RNA ribosómico (rRNA), libera nucleótidos que o bien sirven para la síntesis de nuevo RNA (presumiblemente mRNA), o bien se degradan y sirven como fuente de energía. En *E. coli*, aproximadamente del 20-30% del RNA total es degradado durante las cuatro primeras horas de ausencia de fuente de carbono. Transcurrido este período, la tasa de degradación disminuye, pasando a ser de un 10% durante las 20 h siguientes. La muerte celular producida por la ausencia de fuente de carbono parece estar relacionada con la degradación total de los ribosomas (McCann *et al.*, 1992).

La presencia de polímeros de reserva tales como los PHA no impide la degradación del RNA, pero aumenta la capacidad de supervivencia de la bacteria porque los PHA son catabolizados para producir energía, mientras que los ribonucleótidos liberados se emplean para la síntesis de nuevo RNA. Las proteínas de los ribosomas parece que se asocian a la membrana celular para protegerla de la degradación, y al mismo tiempo están disponibles para la formación de nuevos ribosomas cuando se sintetice nuevo rRNA. La degradación de proteínas también es significativa durante la ausencia de nutrientes. Como en el caso del RNA, los aminoácidos libres producidos en la degradación pueden ser o bien reutilizados para la síntesis o bien degradados para producir energía. La concentración absoluta de constituyentes celulares no determina la longevidad; la clave de la supervivencia en situación de inanición depende de la capacidad de regular la tasa de degradación de las macromoléculas (McCann *et al.*, 1992).

Los factores σ controlan la expresión génica de determinados promotores en situaciones de estrés. Estos factores σ son proteínas que se unen a la RNA polimerasa y reconocen diferentes secuencias de promotores. La expresión de determinadas proteínas no sólo proporciona protección frente a la ausencia de nutrientes sino también frente a otras situaciones de estrés. BofA es una proteína que regula la expresión de diferentes genes; el producto de uno de estos genes, DacA (D-alanina carboxipeptidasa), aumenta las uniones cruzadas del peptidoglicano, lo que refuerza la pared celular de las bacterias en inanición. Las proteínas codificadas por el operón *otsBA* (más conocida por *pexA*) estimulan la biosíntesis de trealosa, que parece estabilizar la membrana citoplasmática y protege frente al estrés osmótico. Durante la inanición también se incrementa el estrés oxidativo. En esta situación, se sintetizan proteínas que destruyen los agentes oxidantes, (como es el caso de las hidroxiperoxidasas I y II

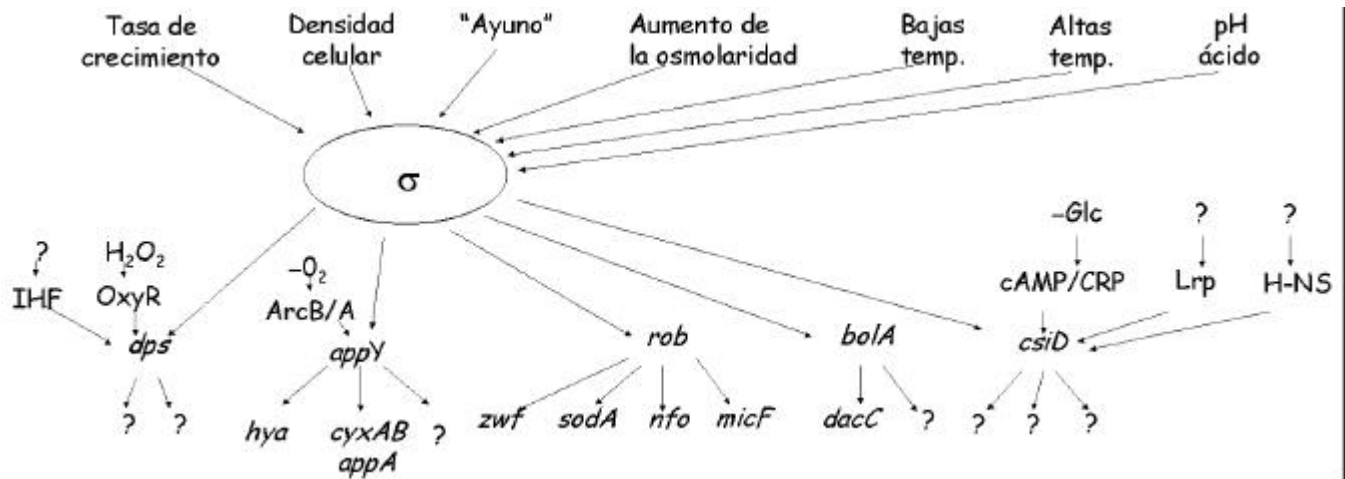


Fig. 1. Esquema de la regulación global en situación de estrés en *Escherichia coli*, en el que se muestra los factores que determinan la activación del factor σ y cómo éste desencadena una cascada de activación de diferentes genes ("reguladores secundarios"), que a su vez actúan sobre otros. En ocasiones, los reguladores secundarios pueden activarse directamente al responder a una situación estresante determinada, como la presencia de agentes oxidantes. (Adaptado de Prokaryotic Gene Expression, S. Baumberg [ed.], 1998, Oxford University Press.)

–KatG y KatE, respectivamente–, que actúan eliminando el H_2O_2 , y proteínas que reparan los daños producidos por esos agentes oxidantes. La exonucleasa III (XthA) y AidB están implicadas en la reparación del DNA. PexB es otra de estas proteínas que parecen estar implicadas en la inducción de proteínas adicionales que también protegerían al DNA contra el estrés oxidativo. Las proteínas de choque térmico (*heat-shock proteins*, Hsp), o chaperoninas, como DnaK y GroEL, etc., serían responsables de mantener una correcta conformación de las proteínas (Fig.1; Matin, 2000.)

Estrategias de supervivencia en las células diferenciadas

En condiciones ambientales adversas, o en el estado tardío de la fase exponencial, diversas bacterias desarrollan una vía de diferenciación controlada, tras la cual se produce una marcada alteración de la estructura celular (Fig. 2). Se pueden formar endosporas (p. ej. en *Bacillus* o *Clostridium*), mixosporas (p. ej. en *Myxococcus*), cistes (p. ej. en *Azotobacter*) o acinetos (p. ej. en la cianobacteria *Anabaena*, donde los acinetos se sitúan normalmente adyacentes a los heterocistes). Estas formas alternativas comparten características comunes, como un protoplasma denso, capas celulares adicionales, resistencia a la radiación ultravioleta y a la desecación, y metabolismo quiescente ("vida latente").

La producción de esporas, en general, es un fenómeno extendido entre los microorganismos. Las endosporas, en particular, son casi exclusivas de las numerosas especies de los géneros *Bacillus* y *Clostridium*. Las esporas tienen dos funciones

principales: actúan como agentes de dispersión, debido a su pequeño tamaño (como es el caso de *B. anthracis*), y son las formas de supervivencia en condiciones adversas (calor, desecación). La producción de esporas (esporulación) forma parte del ciclo vital de las bacterias que la presentan, y no son consecuencia de la exposición inmediata a una situación crítica, como todavía dicen algunos libros. La esporulación comienza normalmente cuando cesa el crecimiento vegetativo debido al agotamiento de nutrientes. Suele suceder en la última etapa del crecimiento exponencial de la

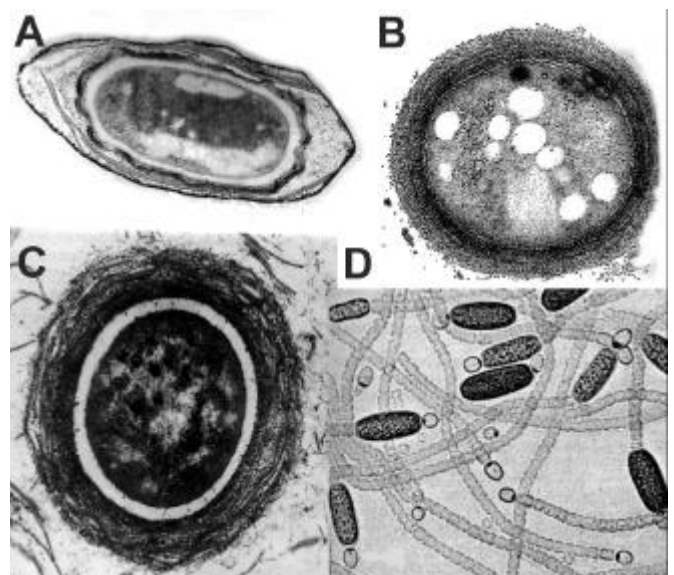


Fig. 2. Formas de resistencia bacteriana a las condiciones de vida adversas. A) Endospora. B) Mixospora [Brock Biology of Microorganisms 9ª Ed., 2000, Prentice-Hall, pp. 93 y 496]. C) Ciste. D) Acinetos [The Prokaryotes, 2ª Ed., Vol. I, Springer-Verlag, pp. 213 y 327].

población. Un cultivo continuo de *B. megaterium*, por ejemplo, puede mantenerse sin esporular si se mantienen las condiciones estables en el quimios-tato.

La esporulación en *Bacillus* spp. es un proceso complejo de diferenciación celular en el que inter-vienen unos 200 genes y tarda aproximadamente 8 horas. Primero se duplica el DNA, después se forma un filamento axial de material nuclear, y la membrana citoplasmática produce un plegamien-to interno, que engloba parte del DNA y origina el septo asimétrico de la preespora. La membrana citoplasmática continúa creciendo y rodea a la espora inmadura con una segunda membrana. Entre ambas membranas se forma el córtex (capa de peptidoglicano modificado). En la espora madura, el protoplasma de la espora contiene dipicolinato cálcico, rodeado por el córtex y por una cubierta proteica constituida por cisteína y aminoácidos hidrofóbicos. Una endospora podría considerarse, por tanto, el resultado de una divi-sión por bipartición en la que la célula "hija" que sobrevive lleva consigo el cadáver de su "herma-na", que no llegó a término, y al que llamamos exosporio.

Las endosporas resisten el proceso de ebullición. La temperatura de 100°C no inactiva las endosporas, y son necesarias temperaturas más altas para destruirlas. El desarrollo de la termo-resistencia se debe a la incorporación masiva de Ca^{2+} por la célula esporulante y a la síntesis en gran cantidad de ácido dipicolínico. El dipicolina-to se encuentra en forma de quelato de calcio, y se localiza fundamentalmente en el protoplasma. Las endosporas, además, son muy resistentes a muchas sustancias químicas utilizadas en la higienización de instalaciones industriales y hos-pitalarias. Las endosporas son las formas de vida más resistentes conocidas, con la posible excep-ción de los priones. Los procesos que conducen a su destrucción completa (esterilización en auto-clave, glutaraldehído o formaldehído) deben ser aplicados concienzuda y exhaustivamente. Después de un ciclo de esterilización, debemos asegurarnos que todo el contenido del autoclave ha sido sometido a la temperatura y tiempo requeri-dos. Para controlarlo, el procedimiento más efi-caz es observar la posible supervivencia de espo-ras de un *Bacillus* especialmente resistente, *B. ste-arothermophilus*. La resistencia térmica de las endosporas varía considerablemente según la especie y parece depender de la temperatura ópti-ma de crecimiento del microorganismo. De tal manera que *Bacillus subtilis*, con un óptimo de crecimiento de 37°C, es más sensible al trata-miento térmico que *B. stearothermophilus*, con un

óptimo de 55°C. En la industria alimentaria y hos-pitales, la aplicación de una temperatura y un tiempo de exposición determinado es esencial para asegurar que un alimento –conservas en lata–, o material quirúrgico o médico, esté libre de microorganismos (incluidas las endosporas).

Longevidad procariótica

Ya hemos visto que los microorganismos dispo-nen de diferentes mecanismos para hacer fren-te a un medio hostil. Pero, ¿cuántos meses o años puede una bacteria (célula vegetativa o formas de resistencia) permanecer como bellas durmientes en espera de que el príncipe (condiciones óptimas para el crecimiento) las despierte? Al estado fisio-lógico de estos organismos de "vida latente" se le ha denominado anabiosis o criptobiosis.

A lo largo de los últimos 80 años, han apareci-do diferentes publicaciones sobre organismos que vuelven a la vida activa después de un periodo de tiempo en estado latente. Kennedy *et al.* (1994) han hecho una magnífica revisión sobre el tema. Durante mucho tiempo, los datos sobre posible reanimación de bacterias antiguas eran tomados con suspicacia o considerados con incredulidad. De hecho, los primeros investigadores en el campo, Gallipe (en 1921), Lipman (en 1928), Lieske (en 1931), etc., fueron muy criticados, pre-cisamente porque afirmaban que la longevidad de la vida podría ser de cientos de millones de años, idea revolucionaria para la época (Kennedy *et al.*, 1994). En concreto, Gallipe declaró haber resuci-tado microorganismos de meteoritos, reabriendo el debate de la panespermia iniciado por Svante Arrhenius en 1908 –quien, por cierto, basaba su idea en la asunción de que las esporas podían via-jar por el espacio interestelar–. En 1954, Jacotot y Virat publicaron en *Ann. Inst. Pasteur* un artículo que ahora tendría tremenda actualidad; su título, "*La longevité des spores de B. anthracis (premier vaccin de Pasteur)*". A partir de 1990, se "acepta" que la vida potencialmente puede mantenerse latente durante millones de años, siempre y cuan-do se cumplan una serie de requisitos. Aun así, es lógico mantener cierto escepticismo sobre los resultados presentados hasta que no se comprue-be su reproducibilidad. Para hacer plausibles (aunque no seguras) las observaciones sobre la preservación de la vida, se deberían cumplir algu-nas premisas, como son: (i) la determinación fide-digna de la edad geológica de la muestra donde se ha encontrado el microorganismo, (ii) la demos-tración de los pasos seguidos para tener la certe-za, o una alta probabilidad, de no contaminación por bacterias modernas (ubicuas), durante el

muestreo o posterior manipulación, y (iii) la comprobación de que el microorganismo (o material genético) no haya "entrado" después de la formación del depósito (ámbar o cristal de sal, por ejemplo). Para evitar este posible problema se debe observar detenidamente la muestra y comprobar que no tiene fisuras, cambios en la cristalización, etc. Aparte de por la antigüedad de la roca donde se encuentran, la edad de los microorganismos "activados" puede determinarse mediante la "datación genética", suponiendo una tasa constante de mutación. Se ha estimado que el rango de cambio de aminoácidos es de 0,1 a 10 por 10^6 años. La mayor parte de la información sobre los microorganismos no recae sobre el DNA, sino sobre el RNA 16S (para los procariotas; para los eucariotas, 18S).

La Tabla 1 muestra algunos de los microorganismos preservados de muestras con más de 1.000 años de antigüedad.

En 1962, Peter Sneath (que a la sazón trabajaba en el National Institute of Medical Research, en Mill Hill, Londres) dio un punto de referencia para establecer la longevidad de las endosporas. Sabía que una suspensión de esporas de *B. anthracis* preparada por Pasteur en 1888 era viable todavía en 1956, y que en una lata de conservas de 118 años se habían encontrado esporas de un microorganismo termófilo. En los herbarios de los Kew Gardens de Londres existía una colección de plantas desecadas, algunas de las cuales habían sido recogidas y preparadas en el s. XVII. Sneath encontró esporas viables en plantas recolectadas en 1640. Representó una gráfica de supervivencia y, a partir de datos publicados sobre el número de *Bacillus* que se encuentran en el suelo, predijo que una tonelada de suelo seco conservaría unas cuantas esporas viables incluso pasados 1000 años. Los ensayos fueron realizados rigurosamente y no ofrecen dudas sobre su repetibilidad. Por otra parte, en otra excelente revisión, Potts (1994) describe cómo algunas bacterias, comprendidas las que forman esporas, pueden permanecer en un estado criptobiótico –desecadas– durante

varios millones de años. Nicholson *et al.* (2000) resumen los avances recientes de cómo las endosporas resisten la inactivación por diferentes situaciones de estrés impuestas por ambientes terrestres y extraterrestres. La desecación juega un papel determinante en la ecofisiología de las comunidades bacterianas dentro de las rocas, en el suelo, en el polvo e incluso en la piel de los animales y humanos, donde puede ser un mecanismo de transmisión de enfermedades –p. ej., fiebre Q por *Coxiella burnetii*, o carbunco, por las endosporas de *B. anthracis*–.

Un argumento en contra de la preservación longeva de la vida se basaba en la observación de muestras de DNA antiguo extraídas de especímenes de los museos o de descubrimientos arqueológicos, en el que sólo 1% del DNA se estimaba no degradado. Si el DNA se rompe con facilidad, ¿cómo podrá un microorganismo sobrevivir durante millones de años? El DNA de estos especímenes se extraía a partir de muestras de tejidos muertos, pero ¿qué pasa con el DNA de los microorganismos reanimados que continúan "vivos" hasta la actualidad? Hay razones para creer que el DNA bacteriano puede "sobrevivir" más tiempo que el de los eucariotas, basándose en la especial composición química y estructura de las esporas. Sus hélices de DNA están intercaladas y estabilizadas con sales orgánicas y dipicolinato cálcico. Su genóforo circular y único está saturado con pequeñas proteínas que provocan un cambio conformacional en la estructura del DNA. Estos múltiples mecanismos de resistencia protegen del daño hidrolítico y oxidativo al DNA y, en conjunto, a toda la espora (Cano *et al.*, 1994; Gerhartdt, 1998). Otro punto a tener en cuenta es el origen de las muestras, y la duda razonable de si los microorganismos aislados son antiguos o contemporáneos. Los microorganismos han sido frecuentemente aislados de muestras recogidas de sitios "inaccesibles", como suelo de centenares de metros de profundidad, bloques de sal enterrados o piedras de templos egipcios. Según se pensaba, la probabilidad de que un microorganismo pene-

Tabla 1. Microorganismos preservados (posiblemente) durante largos períodos de tiempo.

Edad estimada (años)	Microorganismo	Origen de la muestra	Referencia
650×10^4	Diversos	Rocas	Lipman (1931)*
650×10^4	<i>Bacillus circulans</i>	Salmueras	Dombrowski (1960)*
$25-40 \times 10^4$	<i>Bacillus sphaericus</i>	Abeja en ámbar (abdomen)	Cano & Borucki (1995)
$25-40 \times 10^4$	<i>Staphylococcus succinus</i>	Ámbar	Lambert <i>et al.</i> (1998)
120×10^4	Diversos	Ámbar	Greenblatt <i>et al.</i> (1999)
$11-40 \times 10^4$	Diversos	Lago Vostok	Karl <i>et al.</i> (1999)
250×10^6	<i>Bacillus marismortui</i>	Cristal de sal	Vreeland <i>et al.</i> (2000)

* Citada en Kennedy *et al.* (1994)

trara o llegara a las zonas profundas era muy pequeña. Nadie creía que la vida fuera posible a grandes profundidades, debido a las elevadas temperaturas, a la enorme presión y a la escasez de nutrientes. Sin embargo, esta situación ha cambiado; se han encontrado microorganismos en testigos (*cores*) de rocas profundas, tomando siempre las medidas necesarias para evitar la contaminación con microorganismos contemporáneos ubicuos. Se han encontrado bacterias quimiolitotrofas estrictas en profundidades de hasta 2.800 m en rocas sedimentarias y de 5.300 m en acuíferos de rocas ígneas, donde las temperaturas pueden estar entre 75°C y 90°C y hay agua líquida a una gran presión (Guerrero, 1998; Pedersen, 2000).

Límite de la vida en células diferenciadas y no diferenciadas

En este artículo se ha hablado de la tenacidad de la vida procariótica, de su lucha por no morir o de su capacidad de recuperarse después de pasar mucho tiempo en estado latente. ¿Pero cuánto tiempo exactamente? Las publicaciones sobre la longevidad de las endosporas indican su viabilidad, es decir la capacidad de germinar y desarrollarse como células vegetativas (germinación) durante varias décadas como mínimo, y probablemente durante mucho más tiempo. En 1981 se colocó en un medio de cultivo una suspensión de esporas de *Clostridium acetivum* preparada en 1947, y en menos de 12 h de incubación ya se observaba crecimiento. El análisis microbiológico de restos arqueológicos romanos hallados en el Reino Unido, con unos 2000 años de antigüedad, permitieron descubrir un gran número de esporas viables de *Thermoactinomyces*. Finalmente, en 1995, Raúl Cano, de la California Polytechnic State University, publicó en Science el todavía discutido trabajo de la "resurrección" de esporas bacterianas del intestino de una abeja atrapada en ámbar de la República Dominicana, cuya edad se estimaba de 25 a 40 millones de años (Cano y Borucki, 1995).

La mayoría de los trabajos posteriores sobre resurrección de esporas se dedican a los microorganismos hallados en ámbar. El ámbar está constituido por una mezcla compleja de compuestos de terpenos, ácidos, alcoholes y azúcares, secretado por las células del parénquima de diversas plantas. En el caso del ámbar dominicano (yacimientos de Jorge Caridad) se trata de la leguminosa *Hymenaea portera* (localmente llamada "algarroba"). En otros casos, se trata de resinas de gimnospermas. Estas resinas se han utilizado como preservantes como mínimo desde el 5.000 a.C.

Durante siglos, los egipcios las utilizaron para empapar las telas que envolvían los cadáveres. Los componentes de la resina inhibían la descomposición y ayudaban en el proceso de momificación. En la Grecia clásica, y todavía ahora, los griegos añadían unas gotas de resina a un tipo vino (denominado "retsina"), para detener la fermentación y evitar el deterioro debido a la proliferación de microorganismos. En la actualidad, el ámbar presenta un renovado interés científico por su capacidad de preservar organismos y material genético de tiempos muy lejanos. Como hemos dicho, Cano y Borucki (1995) pretenden haber reavivado una espora de *Bacillus sphaericus* encontrada en el abdomen de una abeja atrapada en el ámbar miocénico. Más recientemente, Greenblatt *et al.* (1999) hacen una descripción de la diversidad de microorganismos aislados del ámbar (véase la Tabla 1). Los organismos atrapados en el ámbar constituyen una ventana de estudio de las relaciones simbióticas primitivas que

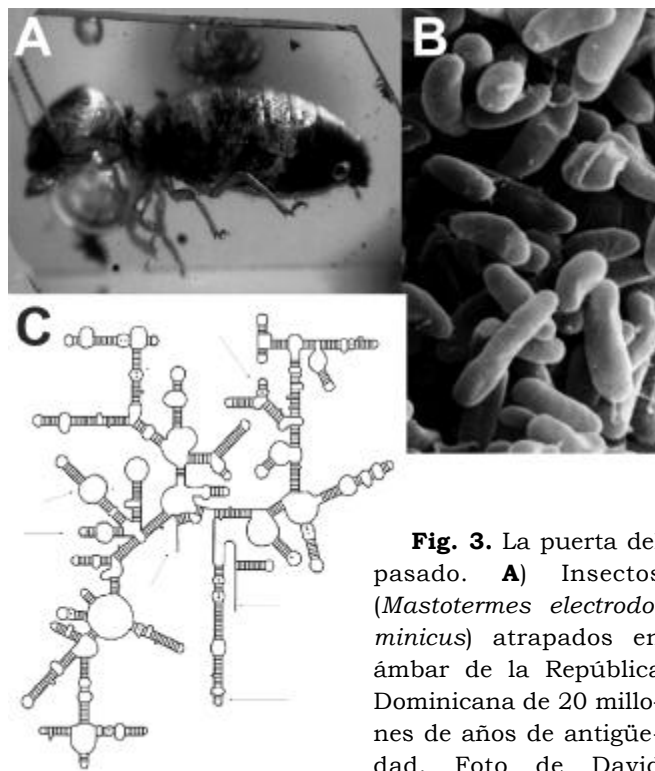


Fig. 3. La puerta del pasado. **A)** Insectos (*Mastotermes electrodominicus*) atrapados en ámbar de la República Dominicana de 20 millones de años de antigüedad. Foto de David Grimaldi [cubierta de

INTERNATIONAL MICROBIOLOGY 3 (4), Diciembre 2000]. **B)** Microorganismos (*Bacillus* sp.) aislados y "resucitados" a partir del abdomen de los insectos fosilizados en el ámbar [Brock Biology of Microorganisms 9ª Ed., p. 56]. **C)** La molécula de 16S rRNA, utilizada en la construcción de árboles filogenéticos. Las flechas indican las posiciones en las que las suelen diferir las bacterias (eubacterias) [Microbiología 4ª Ed., Prescott *et al.* 1999, Interamericana, p. 421].

contribuirá significativamente a entender la evolución (Fig. 3).

La tenacidad de la vida de nuevo se ha puesto de manifiesto con el trabajo de Vreeland *et al.* (2000), que describe el aislamiento y cultivo de una bacteria halotolerante de un cristal de sal con una antigüedad de 250 millones de años. El análisis de esta cepa la "emparenta" con *Bacillus marismortui*, aislada de una botella cerrada y almacenada durante 57 años que contenía agua del mar Muerto. En los cristales de sal no se han encontrado formas de resistencia tales como esporas. ¡Se trata de la activación de una célula vegetativa! De ser cierto, se convertiría en el ser vivo conocido que más tiempo ha permanecido vivo sobre la Tierra. Podemos preguntarnos cómo es posible que los biopolímeros bacterianos permanezcan intactos durante millones de años, si estas bacterias son lo suficientemente activas para repararlos, o qué energía utilizan para este fin. Pero, por ahora, todo ello constituye un misterio.

Los estudios de recuperación de microorganismos antiguos representan el inicio de un nuevo campo de investigación de la longevidad. ¿Cuánto tiempo vive un microorganismo? ¿Cuál es el límite máximo? Por ahora sólo, sabemos que los límites son superiores a los que se creía previamente. Cuando la afirmación sobre la increíble longevidad de las esporas o células vegetativas esté sustentada por la repetición de los resultados en laboratorios independientes, eso significará que las endosporas pueden permanecer, en determinadas condiciones, viables indefinidamente. Algunos procariontes, por consiguiente, resultarían prácticamente inmortales. La formación de esporas representa una estrategia con la que la célula escapa temporalmente a unas condiciones adversas, como la privación de nutrientes, la limitación de agua, o la temperatura elevada, mediante un estadio durmiente. Además, las esporas pueden "desplazarse" (pasivamente) por la acción del viento, del agua o de otros seres vivos, lo que les ofrece la posibilidad de llegar a un ambiente distinto, favorable para la germinación. Las esporas representan una forma celular, y una estrategia de supervivencia, que contribuyen a evitar la muerte, a desplazarse a lugares nuevos y a permanecer vivas (aunque durmientes) durante mucho tiempo. Una bacteria esporuladora no puede predecir cuánto tiempo o en qué ambiente permanecerá en estado aletargado. Pero haciéndolo, "preparándose para lo peor", las bacterias que esporulan parecen escapar durante un tiempo indefinido a lo que parecía una norma general en los seres vivos, la limitación temporal de la vida, el fenómeno inescapable de la muerte.

Bibliografía

- Cano RJ, Borucki MK, Higby-Schweitzer M, Poinar HN, Poinar GO, Pollard KJ (1994) *Bacillus* DNA in fossil bees: an ancient symbiosis? Appl. Environ. Microbiol. 60: 2164-2167.
- Cano RJ, Borucki MK (1995) Revival and identification of bacterial spores in 25 to 40 million year old Dominican amber. Science 268: 1060-1064.
- Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM (1995) Biofilm bacteria. Annu. Rev. Microbiol. 49: 711-745.
- Gerhardt P (1998) Survival of ancient bacteria desiccated within amber: believe it or not? ASM News 64: 68-69.
- Gey GO, Koffman WD, Kubicek MT (1952) Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. Cancer Research 12: 264-265.
- Greenblatt CL, Davis A, Clement BG, Kitts CL, Cox T, Cano RJ (1999) Diversity of microorganisms isolated from amber. Microb. Ecol. 38: 58-68.
- Guerrero R (1998) Crucial crisis in biology: life in the deep biosphere. Internatl. Microbiol. 1: 285-294.
- Karl DM, Bird DF, Björkman K, Houlihan T, Schackelford R, Tupas L (1999) Microorganisms in the accreted ice of Lake Vostok, Antarctica. Science 286: 2144-2147.
- Kennedy MJ, Reader SL, Swierczynski LM (1994) Preservation records of micro-organisms: evidence of the tenacity of life. Microbiology 140: 2513-2529.
- Lambert LH, Cox T, Mitchel K, Rosselló-Mora R, Del Cueto C, Dodge DE, Orkand P, Cano RJ (1998) *Staphylococcus succinus*, sp. nov., isolated from Dominican amber. Int. J. System. Bacteriol. 48: 511-518.
- Matin A (2000) Bacterial starvation. En Lederberg J (ed.), Encyclopedia of Microbiology, 2a ed. Academic Press, pp. 394-403.
- McCann MP, Kidwell J, Matin A (1992) Microbial starvation survival, genetics. En Lederberg J (ed.), Encyclopedia of Microbiology, 1a ed. Academic Press, pp. 159-170.
- Nicholson WL, Munakata N, Horneck G, Melosh HJ, Setlow P (2000) Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 64: 548-572.
- Pedersen K (2000) Exploration of deep intraterrestrial microbial life: current perspectives. FEMS Microbiol. Letters 185: 9-16.
- Potts M (1994) Desiccation tolerance of prokaryotes. Microbiol. Rev. 58: 755-805.
- Sneath PHA (1962) Longevity of microorganisms. Nature 195: 643-646.
- Vreeland RH, Rosenzweig WD, Power DW (2000) Isolation of a 250 million-year-old halotolerant bacterium from a primary salt crystal. Nature 407: 897-900.

Probióticos, prebióticos y salud

Domingo Marquina y Antonio Santos

Dpto. de Microbiología III, Facultad de Biología

Universidad Complutense. 28040-Madrid.

E-mail: dommarq@eucmax.sim.ucm.es

El estilo de vida es, entre otros, el responsable del aumento de determinadas enfermedades, sobre todo de las causadas por microorganismos. La falta de actividad física, el consumo de alimentos ricos en hidratos de carbono refinados y grasas, y el escaso aporte de fibra en la dieta son la base de muchas enfermedades actuales.

La dieta consumida hace un millón de años por nuestros antecesores contenía un 50% menos de proteínas, un 75% menos de grasas saturadas y un 90% menos de sodio. El hombre del Paleolítico consumía entre 4 y 10 veces más fruta y fibra que el actual, lo que le aportaba 10 veces más vitaminas y antioxidantes. Pero la más llamativa diferencia con nuestros ancestros es que en su dieta ingerían diariamente más de 10^9 bacterias beneficiosas para la salud, entre otras, distintas especies de *Lactobacillus*. Este aporte de microorganismos beneficiosos para la salud era debido a que estos alimentos, sobre todo vegetales, eran almacenados durante mucho tiempo produciéndose fermentaciones, entre ellas la láctica. Algunos de estos alimentos se siguen consumiendo en la actualidad como el *ogi* (Africa), el *kenkey* (Ghana) y el *pozol* (Méjico). El consumo de alimentos vegetales fermentados en los países desarrollados está en franco receso, tan sólo en algunos países se consumen *sauerkraut* y salsa de soja, entre otros. En cambio, el consumo de productos lácteos fermentados está aumentando, siendo los países del Este de Europa los mayores consumidores [1].

Ilya Metchnikoff, en 1900, centró sus estudios en demostrar que el consumo de uno de estos alimentos, el yogur, era el responsable de la gran longevidad de los habitantes de Bulgaria. Desde entonces y hasta el día de hoy ha crecido el interés por estos alimentos con microorganismos beneficiosos para la salud, y más concretamente por los productos lácteos fermentados [2].

Directamente relacionados con estos productos surgen los conceptos de **probiótico**, **prebiótico** y **alimento funcional**. Hacia 1970 un microorganismo **probiótico** se definía como “un microorganismo que se utiliza como suplemento en la alimentación animal, para aumentar el crecimiento y reducir el estrés”. Desde entonces, esta definición ha evolucionado notablemente, de forma que hoy se define **probiótico** como “un microorganismo vivo que se introduce en la dieta, y que tras ser

ingerido en cantidad suficiente ejerce un efecto positivo en la salud, más allá de los efectos nutricionales tradicionales”.

Un **prebiótico** se define como “un ingrediente alimenticio no digerible que produce un efecto beneficioso en el hospedador al estimular el crecimiento selectivo y/o la actividad metabólica de un número limitado de bacterias en el colon” [3].

Finalmente, e íntimamente relacionado con los anteriores, surge el concepto de **alimento funcional**. Un alimento es funcional si sus componentes (que pueden ser o no nutritivos) tienen un efecto sobre una o varias funciones del organismo originando un efecto positivo sobre la salud. (*International Life Science Institute*) [4].

Los probióticos hasta ahora conocidos son los lactobacilos y las bifidobacterias. Algunos de los efectos beneficiosos que producen estos microorganismos sobre la salud se describen a continuación.

Reducción de la intolerancia a la lactosa.

La intolerancia a la lactosa es un problema que padece entre el 50 y el 70% de la población mundial en distinto grado. Este problema es debido a la ingestión de productos que contienen lactosa (principalmente leche no fermentada) y los bajos niveles de β -galactosidasa intestinal.

La lactosa es una sustancia osmóticamente muy activa y su presencia en la luz intestinal ocasiona la salida de fluidos e iones de la mucosa intestinal al exterior hasta alcanzar el equilibrio osmótico. Esto ocasiona una diarrea profusa. La ingestión de probióticos de forma continuada, bien liofilizados o como yogur, ha permitido reducir considerablemente la mala absorción de la lactosa. Este efecto parece deberse al aporte de β -galactosidasa exógena proporcionada por *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus* del yogur. El tránsito intestinal se ralentiza permitiendo una mejor hidrólisis de la lactosa y la posterior adsorción de sus componentes [5].

Efecto protector ante infecciones y estimulación del sistema inmune.

La microbiota intestinal ejerce un papel importante en el efecto barrera de la mucosa intestinal frente a infecciones. Sus mecanismos de

acción son muy variados: modificar los niveles de adhesión celular, producir sustancias antimicrobianas o la estimulación de órganos linfoides asociados al tracto intestinal. El resultado es una estimulación del efecto barrera que puede prevenir la invasión de patógenos.

La cepa RC14 de *Lactobacillus reuteri* produce un biosurfactante que reduce la capacidad de adhesión a la mucosa intestinal de *Clostridium difficile*, patógeno oportunista intestinal [6]. Así mismo, la cepa CRL-431 de *Lactobacillus casei* ha mostrado su capacidad para eliminar microorganismos patógenos del intestino, como cepas enterotoxigénicas de *E. coli*, *Lysteria monocitogenes*, *Shigella sunnei* y *Salmonella typhimurium*, tanto en estudios *in vitro* como con animales de experimentación [7].

La producción de sustancias antimicrobianas como las bacteriocinas por parte de los probióticos ha mostrado también tener un efecto positivo frente a las gastroenteritis producidas por cepas de *E. coli* y *Campylobacter* reduciendo las mismas considerablemente [8].

El *yakult* es un producto láctico japonés que se estima se consume de forma diaria por un 10% de la población de este país. Este producto contiene cepas de *Lactobacillus casei* que han mostrado su eficacia frente a infecciones intestinales en niños producidas por rotavirus, y tienen efectos antitumorales en ratón. Estos efectos pueden ser debidos a las glicoproteínas secretadas por las propias bacterias [9].

Otro aspecto interesante es la reducción de candidiasis y la restauración de la microbiota vaginal mediante la ingestión de probióticos. En la flora vaginal predominan los lactobacilos, y más concretamente *L. acidophilus*. Los cambios hormonales que suceden durante la menopausia producen cambios en la microbiota, facilitando las infecciones oportunistas por *Candida* y *E. coli*. La aplicación directa mediante cremas u óvulos gine-

cológicos de *Lactobacillus fermentum* B54 ha mostrado la restauración de la microbiota y la reducción del riesgo de infecciones oportunistas en mujeres menopáusicas. Hilton en 1992 comprobó que la ingestión de 227 gramos de yogur diarios reducía significativamente el riesgo de estas infecciones frente al control.

Se sabe poco del efecto de los probióticos sobre el sistema inmune. Las primeras experiencias indican que en niños tratados con *L. casei* la cantidad de Ig A circulante es más elevada que en los no tratados y que su respuesta ante infecciones del tracto digestivo es mucho mejor. De igual forma, la ingestión de alimentos enriquecidos con *L. casei* y *Bifidobacterium bifidum* aumenta la actividad de los granulocitos circulantes, así como la estimulación en la producción de citocinas por parte de los monocitos, interferón- γ , IL-1 β , y TNF- α [10].

En animales de experimentación se ha visto que el consumo de probióticos reduce en la masa fecal la cantidad de enzimas microbianas como la β -glucuronidasa, nitroreductasa y ureasa que parecen estar involucradas en la producción de sustancias cancerígenas y mutagénicas. Estos mismos efectos se han podido determinar en un grupo de voluntarios que ingieren este tipo de productos frente a un control a los que no se les incluye en la dieta.

Reducción del riesgo de cáncer de colon.

Los malos hábitos alimentarios inducen a la microbiota intestinal a producir sustancias con actividad carcinogénica. Estudios epidemiológicos recientes (1998) han encontrado en cambio que dietas suplementadas con *Lactobacilos* y *Bifidobacterias* reducen el riesgo de contraer cáncer de colon.

En poblaciones urbanas donde existe una mayor incidencia de cáncer de colon muestran

Domingo Marquina es doctor en Ciencias Biológicas por la Universidad Complutense de Madrid, donde inició su labor investigadora. Posteriormente ha trabajado en el Instituto Gulbenkian de Ciencia de Oeiras en Lisboa en distintos aspectos taxonómicos y fisiológicos de levaduras. En la actualidad estudia la caracterización molecular de toxinas *killer* aplicadas a la industria alimentaria, así como el efecto del consumo de probióticos y prebióticos en la dieta de animales de experimentación a medio y largo plazo.



Antonio Santos obtuvo su doctorado en Biología por la Universidad Complutense de Madrid. Desde 1999 trabaja en el Departamento de Bioquímica y Biología molecular III de la Universidad Complutense de Madrid y colabora con el grupo de taxonomía y fisiología de levaduras del Departamento de Microbiología III de la Universidad Complutense de Madrid. Su trabajo de Tesis trató sobre la caracterización bioquímica de la toxina *killer* de *Pichia membranifaciens*.



una mayor dominancia de bacterias del género *Bacteroides* dentro de su flora intestinal frente a poblaciones rurales donde el índice de esta enfermedad es muy bajo y predomina en su flora intestinal las bacterias lácticas [11]. La administración de suplementos dietéticos como las oligofructosas o inulinas favorece el crecimiento de estos últimos microorganismos, resultando muy eficaces en la reducción del adenocarcinoma de colon.

Prebióticos

Como hemos mencionado antes, los prebióticos son sustancias no digeribles que se encuentran en los alimentos. La mayor parte de ellos se incluyen en el grupo de los fructanos similares estructuralmente a la inulina.

La inulina es un polisacárido que se puede extraer de plantas de distintas familias *Liliaceae*, *Amaryllidaceae*, *Gramineae* y *Compositae*, aunque la principal fuente de inulina es la achicoria (*Cichorium intybus*). De esta planta se obtiene un polisacárido complejo [α -D-glucopyranosil-(β -D-fructofuranosyl)_{n-1}- β -D-fructofuranósido], con un número de fructosas comprendidas entre 2 y 70. La inulina nativa es procesada en la industria alimentaria y transformada en fructanos (fructooligosacáridos ó FOS) de cadena corta con un grado de polimerización entre 2 y 10 (normalmente 5) como resultado de la hidrólisis enzimática parcial por la inulinasa (EC 3.2.1.7).

Otros prebióticos son los galacto-oligosacáridos obtenidos por síntesis química a partir de lactosa, los oligosacáridos extraídos de semilla de soja y los xylo-oligosacáridos, obtenidos por hidrólisis química de xylanos y poldextrosas o pirodextrinas.

Estos productos son empleados en Europa y Estados Unidos como condimentos alimenticios en helados, postres, galletas, pastas y alimentos para niños, calculándose su consumo diario por persona entre 1 a 7 gramos. El consumo de estos productos de forma "inconsciente" por la población genera una serie de beneficios, pues la configuración β del carbono anomérico 2 hace que no sean digeribles, al menos en el tracto superior del aparato digestivo, y que sean utilizados preferentemente por la microbiota del colon, transformándolos por vía fermentativa en ácido láctico y otros ácidos orgánicos de cadena corta que estimulan de forma selectiva la proliferación de bacterias lácticas y bifidobacterias en el colon, con los efectos beneficiosos que ya hemos mencionado.

El consumo de prebióticos reduce el riesgo de contraer determinadas enfermedades, incluyendo:

- Supresión de diarreas asociadas a infecciones

intestinales

- Reducción del riesgo de osteoporosis, pues la inulina favorece la fijación del calcio, aumentando la masa ósea.
- Reducción del riesgo de obesidad y de contraer diabetes tipo 2.
- Disminución de la frecuencia de cáncer de colon [12].

La ingestión de prebióticos es causa de la formación de ácidos orgánicos de cadena corta en el colon, debido a la fermentación de los mismos, y el descenso de pH en la luz intestinal aumenta la ionización de elementos como el calcio y el magnesio lo que facilita su absorción por difusión pasiva.

Otro efecto de los prebióticos (oligofructanos derivados de la inulina) es la reducción de los niveles de triglicéridos, colesterol y lipoproteínas en suero. La hipotrigliceremia es debida al descenso en plasma de lipoproteínas VLDL debido a su vez a que los oligofructosidos inhiben la capacidad de esterificación del palmitato hacia triacilgliceroles.

Como hemos visto, las evidencias indican que la ingestión tanto de probióticos como de prebióticos aporta beneficios para la salud. Entonces, debemos hacernos una pregunta. ¿Podemos considerar que estos alimentos son funcionales?. Si atendemos a la definición que de los mismos hace el *International Life Science Institute* la respuesta es sí. Ahora bien, a continuación deberíamos hacernos otras preguntas como: ¿Hasta qué punto son duraderos sus efectos beneficiosos? ¿Es necesario mantener durante toda la vida la ingestión de estos productos para aprovecharse de sus ventajas? ¿Qué sucede al suprimir el aporte de estos alimentos? ¿Qué efectos a largo plazo puede tener la sustitución de poblaciones microbianas del intestino?

En nuestro laboratorio estamos trabajando en un proyecto en el que estudiamos el efecto de un alimento tradicional muy consumido en los países del Este de Europa, el *kefir*, sobre distintos parámetros fisiológicos, microbiológicos e inmunitarios en un modelo murino en poblaciones de distintas edades.

Los resultados que estamos obteniendo nos permiten asegurar que el efecto del consumo de probióticos es multisistémico, afectando (1) al sistema inmune, con proliferación de macrófagos y linfocitos T y (2) a la microbiota intestinal, con la reducción del número de microorganismos anaerobios estrictos del tracto intestinal y el aumento del número de bacterias lácticas respecto a individuos control. Así mismo, se observa una estimulación de determinados parámetros enzimáticos

hepáticos que indican el buen estado del individuo. Evidentemente, este modelo no es automáticamente extrapolable a un modelo humano, pero elegimos este modelo por ser el que más se asemeja al del hombre a nivel inmunológico.

Desde luego queda mucho por hacer, pero cada día son más las investigaciones en este campo y sobre todo cada día es mayor la concienciación de todos nosotros en que hay que abandonar los malos hábitos alimentarios en pro de nuestra salud y nuestro bienestar, tanto interno como externo. En este sentido, los microorganismos probióticos se van consolidando cada vez más, gracias a los resultados científicos obtenidos, como unos buenos aliados de nuestra salud.

Bibliografía:

- [1] Bengmark. S. 2000. Bacteria for Optimal Health. *Nutrition*. 16:611-615
- [2] Trapp, C.L., C.C. Chang, G.M. Halpern, C.L. Keen, and M.E. Gerschim. 1993. The influence of chronic yogurt consumption on populations of young and elderly adults. *Int. J. Immunotherapy*. IX: 53-64.
- [3] Gibson, G.R., M.B. Roberfroid. 1995. Dietary modulation of the human colonic microflora: introducing the concept of prebiotics. *J. Nutr.* 125: 1401-1412.
- [4] Bellisle, F., A.T. Diplock. and G. Hornstra. 1998. Functional food science in Europe. *Br. J. Nutr.* 80(suppl): S3-4.
- [5] Shah, N.P., R.N. Fedorak. and P.J. Jelen. 1992. Food consistency effects of quarg in lactose malabsorption. *Int. Dairy J.* 2:257-269.
- [6] McFarland, L.V. 1999 Biotherapeutic agents for *Clostridium difficile*-associated disease, p. 159-193. In G. W. Elmer, L. MaFarland, and C Surawicz (ed.), *Biotherapeutic agents and infectious diseases*. Humana Press Inc., Totowa, N.J.
- [7] Perdigon, G., S. Alvarez, M.E. Nader de Macias, M.E. Roux, and A.P. de Ruiz Holgado. 1990. The oral administration of lactic bacteria increases the mucosal intestinal immunity response to enteropathogens. *J. Food Prot.* 53:404-410.
- [8] Jakobsen, C.N., V. Rosenfeldt Nielsen, A.E. Hayford. P.L. Moller, K.F. Michaelsen, A. Paerregaard, B. Sandström. M. Tvede and M. Jajobsen. 1999. Screening of probiotic activities of forty-seven strains of *Lactobacillus* spp. by in vitro technique and evaluation of the colonization ability of five selected strains in Humans. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 4949-4956.
- [9] Matsuzaki, T. 1998. Immunomodulation by treatment with *Lactobacillus casei* strain Shirota. *Int. J. Food Microbiol.* 41:133-140.
- [10] Hoerr, R. A. and E.F. Bostwick. 2000. Bioactive protein and probiotic bacteria: modulation of nutritional health. *Nutrition*. 16:711-713.
- [11] Moore, W.E. and L.H. Moore. 1995. Intestinal floras of populations that have a high risk of colon cancer. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:3202-3207.
- [12] Roberfroid MB. 2000. Concepts and strategy of functional food science: The European perspective. *Am. J. Clin Nutr.* 71(suppl):1660-1664S.