

ACADEMIA ASTURIANA DE CIENCIA E INGENIERÍA

DEL EXTRAORDINARIO IMPACTO DE PROCARIOTAS Y VIRUS SOBRE LA TIERRA Y SUS HABITANTES

DISCURSO PRESENTADO EN EL ACTO DE SU INCORPORACIÓN COMO
ACADÉMICA DE NÚMERO POR LA

PROF. MARÍA DEL ROSARIO RODICIO RODICIO

Y CONTESTACIÓN DEL

ILMO. SR. JOSÉ MARIO DÍAZ FERNÁNDEZ

Presidente de la Academia Asturiana de Ciencia e Ingeniería

EL DÍA 25 DE ABRIL DE 2025



c/ San Francisco. Edificio Histórico - Universidad de Oviedo
OVIEDO

ÍNDICE

1	Centrando el tema	1
2	El misterioso trayecto hacia la vida	1
	2.1. Preparando el escenario	1
	2.2. La gran transición	5
	2.2.1. La etapa prebiótica	5
	2.2.2. La etapa protocelular	6
3.	De Reinos y Dominios: el árbol de la vida (celular)	7
4.	Conociendo a LUCA	10
	4.1. La antigüedad de LUCA	11
	4.2. ¿Cómo y dónde vivió?	12
5.	La vida después de LUCA	16
	5.1. Los descendientes de LUCA	16
	5.2. LECA y sus descendientes	19
	5.3. Los límites de la vida	20
6.	Evolución mediante adaptación	22
	6.1. El valor de ser pequeño: mutación y reproducción	22
	6.2. Transferencia genética horizontal	24
	6.3. El poder de las simbiosis	26
	6.3.1. Mutualismo	27
	6.3.2. Parasitismo	30
	6.3.3. Patogenicidad, virulencia y enfermedades infecciosas	31
	6.3.4. La microbiota humana	35
	6.4. Comunicación y comportamiento social: el leguaje de las bacterias	36
7.	¿Y qué hay de los virus?: ¿Cuándo, cómo y por qué surgieron?	38
8.	La batalla entre procariotas y virus	40
	8.1. Las endonucleasas de restricción y el nacimiento de la Ingeniería Genética	41
	8.2. CRISPR-Cas: el sistema inmune adaptativo de los procariotas y el nacimiento de la nueva edición genómica	46

9. Las bacterias, los virus y yo	50
9.1. Los años de <i>Streptomyces</i>	51
9.1.1. Aplicación de los liposomas a transfección de protoplastos de <i>Streptomyces</i>	53
9.1.2. Desarrollo de vectores derivados del bacteriófago Φ C31	54
9.1.3. El sistema de restricción-modificación Sall de <i>Streptomyces albus</i> G	55
9.1.4. Otros estudios	59
9.2. Los años de las bacterias patógenas y su resistencia a los antimicrobianos	61
9.2.1. <i>Salmonella enterica</i>	62
9.2.1.1. Asociación de genes de virulencia y resistencia en plásmidos de los serotipos Typhimurium y Enteritidis	63
9.2.1.2. Propiedades de resistencia del clon monofásico europeo	66
9.2.2. Resistencia a carbapenemas en bacterias Gram negativas procedentes del Hospital Universitario Central de Asturias	69
9.2.3. Resistencia a antibióticos de última línea en bacterias Gram positivas	70
9.2.3.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	70
9.2.3.2. <i>Staphylococcus epidermidis</i>	72
10. Referencias	74
11. Agradecimientos	86

Ilustrísimo Sr. Presidente de la Academia Asturiana de Ciencia e Ingeniería (AACI),
Ilustrísimos Señores Académicos,
Autoridades, compañeros, familiares y amigos,
Señoras y señores,

Es para mí un honor y supone una gran satisfacción estar hoy ante ustedes para presentar mi discurso de entrada en la Academia Asturiana de Ciencia e Ingeniería (AACI)-

1. Centrando el tema

“La vida no es un problema a resolver, sino una realidad a experimentar.”
Søren Kierkegaard (1813-1855)

El discurso que voy a presentar se basa en mi experiencia de más de 40 años como profesora de Microbiología en la Facultad de Biología de la Universidad de Oviedo y en la investigación que llevé a cabo durante ese tiempo, principalmente en esta Universidad, pero también en el Instituto John Innes de Norwich, Inglaterra y en la Facultad de Biología y Química de la Universidad de Osnabrück, Alemania. Incluye, por ello, dos partes diferenciadas: una amplia revisión sobre los procariotas (esto es, bacterias y arqueas) y los virus, que son objeto de estudio de la Microbiología, seguida de una exposición de mis limitadas aportaciones a su amplísimo mundo.

La primera parte describirá la larga trayectoria de procariotas y virus en la Tierra, destacando su indiscutible contribución a la aparición de ese “algo” tan difícil de definir que denominamos vida. Veremos cómo, desde su aparición en los albores del tiempo, los procariotas han conseguido perpetuarse, llegando a colonizar prácticamente cualquier lugar y ejerciendo un extraordinario impacto sobre la Tierra y sus habitantes. Se sirven para ello de la enorme plasticidad de sus genomas, asociada a los procesos de mutación y transferencia genética horizontal, utilizando con impecable maestría la selección natural de Darwin.

2. El misterioso trayecto hacia la vida

“El secreto del cambio es enfocar toda tu energía, no en luchar contra lo viejo, sino en construir lo nuevo.”
Sócrates (470-399 aC)

2.1. Preparando el escenario

Pocos temas resultan tan apasionantes y al mismo tiempo tan difíciles de abordar mediante el método científico como los relativos a los orígenes del universo y de la vida. Estos temas, clave para intentar comprender quiénes somos y de dónde venimos, han sido planteados desde que el hombre es hombre. Comenzando en la antigüedad, todas las civilizaciones han ideado relatos mitológico-religiosos que atribuyen el origen del universo, la vida y muy especialmente el primer ser humano,

a la acción deliberada de un Dios creador -o de más de una deidad- (Figura 1). En general, todos ellos parten del desorden, del caos, siendo el creador (o creadores) el (los) encargado(s) de imponer el orden.



Figura 1. Detalle de la Creación de Adán (Fresco de la Capilla Sixtina. Ciudad del Vaticano. Miguel Ángel Buonarroti; 1475-1564).

A pesar del tiempo transcurrido desde los primeros intentos de explicar nuestros orígenes y de los increíbles avances científico-técnicos, los conocimientos actuales sobre el origen del universo y de la vida son todavía inciertos. En cuanto al inicio del universo, la teoría del Big Bang, que es la más aceptada, lo sitúa hace 13.800 millones de años (Ma). Fue entonces cuando una singularidad infinitamente pequeña, densa, extremadamente caliente y matemáticamente paradójica, comenzó a expandirse (Figura 2) generando una gran cantidad de energía y materia, separándolo todo y creando a la vez el espacio y el tiempo [1]. Para mí, que soy bióloga y no astrofísica, esa minúscula singularidad resulta tan abstracta e incomprensible como el caos de los griegos, que era “todo y nada a la vez y contenía el principio de todas las cosas”.

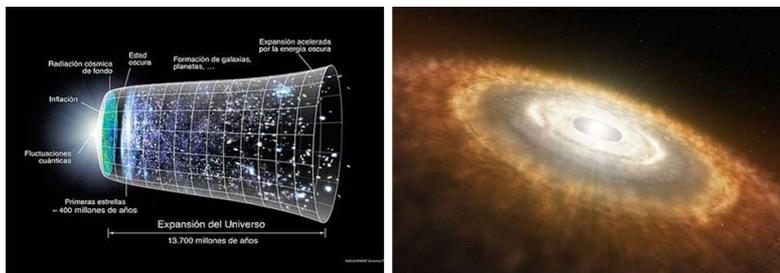


Figura 2. El Big Bang y la expansión del Universo (izquierda; tomado de Wikipedia). Reinterpretación artística del sistema solar temprano, donde la colisión entre partículas en un disco de acreción condujo a la formación los planetas (derecha; tomado de NASA/JPL-Caltec).

Consumidos aproximadamente dos tercios del tiempo total del Universo, hace unos 4600 Ma, tuvo lugar la formación del sistema solar donde se encuentra la Tierra. De acuerdo con la hipótesis nebular, este sistema planetario se originó a partir de una densa nube giratoria de polvo y gas interestelar que sufrió un colapso gravitacional posiblemente a consecuencia de la onda de choque creada por una supernova, esto es, por la explosión de una estrella masiva [2]. Como resultado del

colapso, la mayor parte de la masa (más del 99%) se concentró en el centro de la nube, originando el Sol. Al compactarse la masa, el aumento de la presión en el interior desencadenó la fusión nuclear, combinándose los átomos de hidrógeno para formar helio, desprendiendo ingentes cantidades de radiación electromagnética. La acreción gravitacional de acúmulos menores de materia, que habían quedado aplanados en un disco protoplanetario girando en torno al centro, dio lugar a los planetas, incluida la Tierra cuya edad se calcula en 4567 Ma, junto con otros cuerpos celestes [3]. Después de la fase principal de acreción el planeta comenzó a diferenciarse, completándose la formación del núcleo, el manto y la corteza hace aproximadamente 4530 Ma [3]. Esta fecha marca generalmente el inicio del eón Hádico o Hadeico, el más antiguo de los cuatro eones en que se divide el tiempo geológico de la Tierra. Los otros tres son el Arcaico, el Proterozoico y el Fanerozoico (Figura 3).

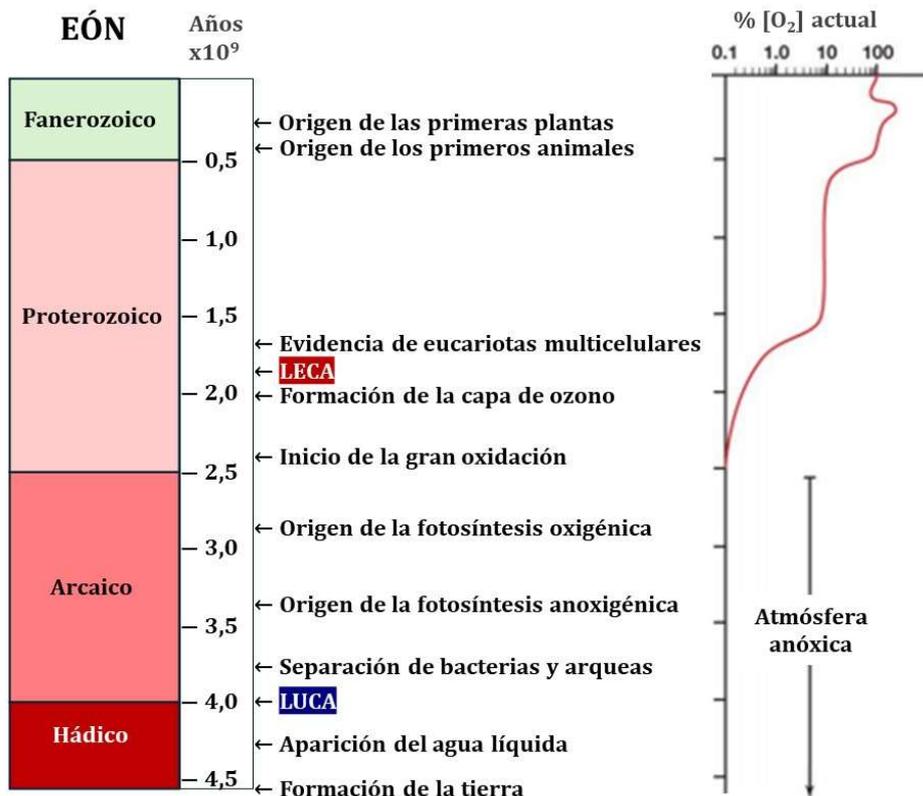


Figura 3. Eones en que se divide el tiempo geológico de la Tierra y principales hitos ocurrido en cada uno de ellos (modificado de [4]).

En los comienzos del Hádico, la colisión de la proto Tierra con un cuerpo gigante, un planetesimal del tamaño de Marte denominado Tea, dio lugar a Luna [3]. El impacto con Tea habría generado suficiente energía como para vaporizar porciones significativas de la corteza y el manto, provocando además la formación de un

océano de magma. Los violentos impactos de la tierra y la luna tempranas con grandes asteroides persistieron durante 4250-3870 millones de años convirtiendo al Hádico en un mundo inhabitable, infernal, con la superficie parcialmente fundida, intenso vulcanismo y temperatura elevada. En alusión a ello, su nombre deriva de Hades, el dios griego del inframundo (Figura 4).



Figura 4. Reinterpretación del aspecto de la Tierra durante el eón Hádico, sometida a un intenso vulcanismo, descargas eléctricas, fuegos y colisiones con otros cuerpos celestes (izquierda; tomado de Wikipedia). Estatua de Hades con Cerbero (derecha; Museo Arqueológico de Creta).

Las condiciones extremas de la Tierra primordial, incluida su elevadísima temperatura, se mantuvieron durante más de 200 Ma. Por entonces el agua ya estaba presente, procedente mayoritariamente de fuentes exógenas, esto es, de cometas y asteroides helados que colisionaron con la tierra en un estadio posterior a su formación conocido como acreción tardía. Sin embargo, debido a la elevada temperatura, en un principio solo habría existido en estado gaseoso. Después la temperatura comenzó a disminuir, con lo que el agua pudo condensarse dando lugar a los océanos. En cuanto a la atmósfera primordial de la Tierra, se piensa que se perdió a raíz del impacto que originó la Luna y que la atmósfera subsecuente (secundaria) se formó a consecuencia de la desgasificación volcánica combinada con el aporte exógeno de compuestos volátiles durante la acreción tardía. Esta atmósfera habría sido menos densa que la actual, anóxica y compuesta mayoritariamente por dióxido de carbono (CO_2) y nitrógeno molecular (N_2), junto con algo de hidrógeno (H_2), vapor de agua, sulfuro de hidrógeno (H_2S) y dióxido de azufre (SO_2) [3]. Gases reducidos, como metano (CH_4), monóxido de carbono (CO) y amoníaco (NH_3), que son más favorables para la síntesis de compuestos orgánicos, podrían haberse generado de manera transitoria, debido a descargas eléctricas o impactos con material rico en hierro durante la acreción tardía. Por ejemplo, el hierro reaccionaría con el agua dando H_2 que, a su vez, reduciría al CO_2 produciendo CH_4 [5].

De cualquier manera, el tiempo estimado para la disminución de la temperatura y la aparición del agua líquida sugiere que solo unos 300 Ma después de la formación de la Tierra ya podrían haber existido condiciones permisivas para la vida [3]. Esas condiciones, aunque incompatibles con las formas de vida más complejas existentes en la actualidad, crearon el escenario para su aparición.

2.2. La gran transición

A raíz de su formación, durante un periodo de tiempo sorprendentemente breve no existió vida en la Tierra; después apareció. Para intentar explicar la extraordinaria transición de lo inanimado a lo animado se pueden considerar, de manera simplificada, dos etapas: la etapa prebiótica y la etapa protocelular que finalmente desembocaron en LUCA (*Last Universal Common Ancestor*), el antepasado común de todas las formas de vida celular que han llegado a nuestros días.

2.2.1. La etapa prebiótica

En una especie de generación espontánea se asume que la vida surgió a partir de una mezcla inanimada de compuestos químicos presentes en la tierra primitiva. Bajo condiciones favorables, estos compuestos reaccionarían para formar las moléculas esenciales para la vida, conocidas como bióticas.

La cuestión de cómo se sintetizaron las moléculas bióticas en condiciones abióticas se abordó por primera vez en la década de 1920, cuando el bioquímico ruso Alexander Ivanovich Oparin (1894-1980) y el biólogo evolucionista británico John Scott Haldane (1860-1936) propusieron la teoría quimiosintética [6, 7] (Figura 5). De acuerdo con ella, los ingredientes químicos necesarios para la vida podrían haberse originado a partir de gases reducidos, como hidrógeno, metano y amoníaco, presentes de manera transitoria en la atmósfera primitiva. Como catalizadores podrían haber actuado la energía solar, la energía eléctrica de las tormentas y/o el calor de las erupciones volcánicas. La teoría quimiosintética ganó credibilidad décadas más tarde, cuando los químicos Stanley Miller y Harold Urey de la Universidad de Chicago llevaron a cabo el famoso experimento que permitió la creación de diversos compuestos orgánicos, mediante el calentamiento y la aplicación de descargas eléctricas a una mezcla de gases reducidos [8, 9] (Figura 5). El experimento Miller-Urey constituyó el punto de partida de una nueva disciplina, conocida como Química Prebiótica o Abiótica, que resulta fundamental para investigar cómo surgió la vida a partir de una mezcla inanimada de compuestos químicos [10]. Desde entonces se han conseguido importantes avances en la síntesis de compuestos orgánicos esenciales para la vida, incluyendo fosfolípidos, azúcares, nucleótidos y aminoácidos (Figura 5), bajo condiciones prebióticas plausibles [11, 12]. Cometas, meteoritos y partículas de polvo interplanetario también habrían aportado compuestos orgánicos a la Tierra primitiva [10]. La aparición de las primeras células debió ocurrir allí donde estuvieran presentes todas estas moléculas, después de un periodo de ganancia en complejidad, incluyendo la formación de biopolímeros (RNA/DNA y proteínas) y la interacción molecular dando lugar a proto metabolismos. Se ha demostrado experimentalmente que redes de reacciones químicas, similares a las que operan en el metabolismo celular actual, pueden ocurrir fuera de las células, en ausencia de genes y enzimas, utilizando metales como catalizadores [13, 14]. De hecho, metales y minerales se han

propuesto como catalizadores del metabolismo prebiótico, encargados de disminuir la energía de activación, esto es la energía necesaria para que una reacción tenga lugar. Se piensa, por ejemplo, que minerales de hierro y azufre podrían haber desempeñado un papel esencial, dada su abundancia en la Tierra primitiva y su semejanza estructural con los clústeres Fe-S ampliamente representados en enzimas actuales [3].

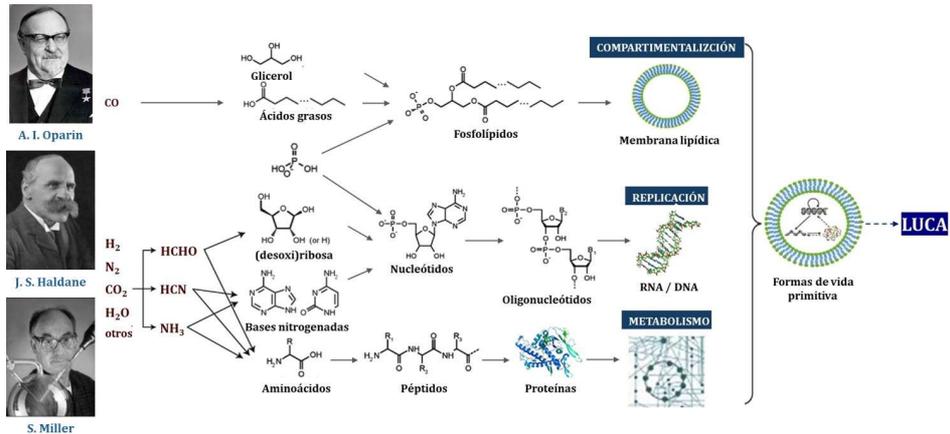


Figura 5. Científicos clave en el inicio de los estudios de química prebiótica (izquierda). Compuestos químicos y rutas de síntesis prebiótica de biomoléculas esenciales para la vida, que intervienen en compartimentalización, replicación y metabolismo (derecha; modificado de [11]).

En cuanto a la energía, la molécula primaria utilizada para alimentar la vida celular en nuestros días es el ATP (adenosina trifosfato). Aunque la síntesis de ADP (adenosina difosfato) y ATP en condiciones prebióticas ha sido demostrada, es improbable que estos compuestos fueran suficientemente estables o se hubieran generado en cantidades suficientes para sustentar las reacciones metabólicas a partir de fuentes abióticas. Como moléculas alternativas se han propuesto el acetilfosfato y tioésteres [13]. Además, gradientes geoquímicos de pH, temperatura, salinidad, etc. podrían haber actuado como fuentes de energía en Tierra prebiótica [15, 16].

2.2.2. La etapa protocelular

En un determinado momento, los componentes necesarios para la vida consiguieron aislarse en compartimentos, donde el medio interno quedó separado del medio externo por una barrera (Figura 5). La compartimentalización constituyó un hito esencial en el camino hacia LUCA. En términos de metabolismo, la separación de los dos medios permite la concentración de reactivos en el interior, incrementando la tasa de catálisis. Las diferentes condiciones a ambos lados de la barrera pueden ser controladas mediante permeabilidad selectiva e intercambios regulados, asegurando el suministro de componentes al sistema y la salida de residuos. Además, la barrera constituye una interfaz privilegiada para la formación

de gradientes que pueden ser explotados para generar energía [12, 17, 18]. Por otro lado, el hecho de tener un sistema separado del medio externo permite el establecimiento y mantenimiento de una identidad propia.

En células modernas, las barreras que crean los compartimentos contienen ácidos grasos unidos a glicerol mediante enlace éster, tanto en bacterias como en eucariotas, mientras que las arqueas presentan cadenas isoprenoides hidrofóbicas unidas a glicerol por enlaces éter. Sin embargo, dada la complejidad de estos compuestos, es posible que los compartimentos prebióticos estuvieran delimitados por otros más sencillos, como ácidos grasos y alcoholes de cadena larga, monoalquilfosfatos y dialquilfosfatos. De hecho, la hidratación de la mezcla de alguno de estos compuestos anfipáticos en condiciones prebióticas plausibles genera bicapas de membrana y vesículas gigantes multilaminares que podrían encapsular biomoléculas [12].

Junto con la compartimentalización y el metabolismo, la replicación es otra propiedad esencial de la vida celular (Figura 5). Dependiendo de cuál de estas dos últimas funciones se considere anterior, existen dos teorías dominantes que pretenden delinear el camino hacia las primeras formas de vida que precedieron a la aparición de LUCA, la teoría del “Mundo RNA” y la teoría del “Metabolismo primero” [19].

El concepto del “Mundo RNA”, apoyado en el descubrimiento de RNAs catalíticos o ribozimas, predice que la vida evolucionó a partir de moléculas de RNA (o muy similares) con capacidad auto replicativa y catalítica [20-22]. Teniendo en cuenta la complejidad estructural de los ácidos nucleicos, el mundo RNA debió estar precedido por una cuantiosa química prebiótica. Por otro lado, la hipótesis de “Metabolismo primero” establece que las rutas metabólicas precedieron a los ácidos nucleicos portadores de la información genética [23]. Las reacciones químicas habrían quedado embebidas en una red de ciclos autosostenibles que progresivamente aumentarían en complejidad.

3. De Reinos y Dominios: el árbol de la vida (celular)

“Llamamos caos al orden que todavía no comprendemos.”
Edward Lorenz (1917-2008)

Actualmente no existen dudas de que la vida celular surgió en el marco del mundo procariota, esto es, de células sin núcleo -el término procariota significa literalmente anterior al núcleo- que sorprendentemente adquirieron la capacidad de vivir. Durante muchísimo tiempo -a escala geológica- los procariotas fueron los únicos habitantes de la Tierra, y durante mucho tiempo -a escala humana-, todos ellos fueron considerados una unidad. De hecho, hasta finales de los la década de 1990, los organismos celulares se distribuyeron en cinco Reinos: *Animalia*, *Plantae*, *Fungae*, *Protista* y *Monera*, agrupando este último a las bacterias que eran los únicos

procariotas entonces conocidos. Los organismos eucariotas con núcleo diferenciado: animales, plantas, hongos y protistas, se repartían entre los otros cuatro Reinos [24].

La unidad de los procariotas se rompió a raíz de los estudios cruciales de Carl Woese, que condujeron al descubrimiento de las arqueas, denominadas originalmente arqueobacterias. Con anterioridad, había sido Linus Carl Pauling el primero en proponer que las secuencias de los ácidos nucleicos y las proteínas podían servir para establecer las relaciones evolutivas existentes entre los seres vivos, esto es, su grado de parentesco [25]. Pauling también introdujo el término “cronómetro molecular” para referirse a estas secuencias. Por ello se considera el padre de la Filogenia molecular, disciplina que permite descifrar la historia de la vida incluso en ausencia de restos fósiles y que ha revolucionado la identificación y clasificación de los seres vivos. Identificación, nomenclatura y clasificación son los pilares básicos de la Taxonomía, cuyo objetivo es poner orden a la diversidad, inmensa y aparentemente caótica, de los seres vivos.

La propuesta de Pauling fue recogida por Woese, que utilizó los genes que codifican los RNA ribosomales (RNAr) 16S de procariotas y 18S de eucariotas como cronómetros moleculares para construir el árbol filogenético de los organismos celulares [26]. En base a ello, Woese derrotó a los cinco reinos vigentes hasta el momento, distribuyendo los organismos celulares en tres Dominios (siendo el Dominio la categoría taxonómica de orden superior en Biología): *Bacteria*, *Archaea* y *Eucarya* (Figura 6).

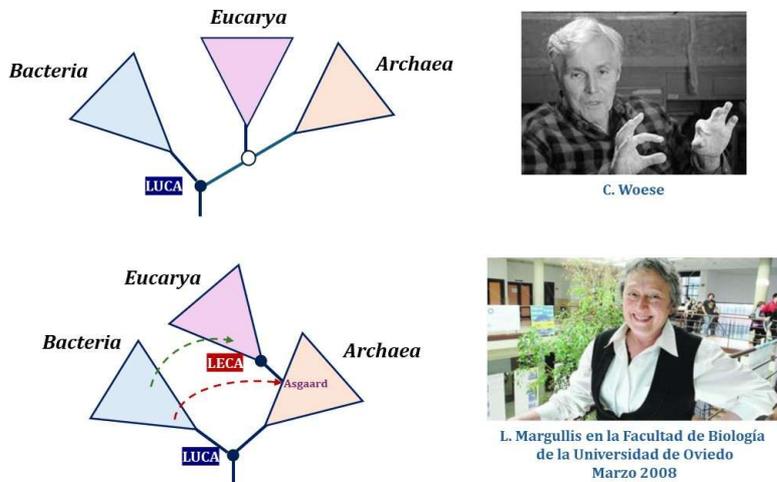


Figura 6. Árbol de la vida de tres dominios (parte superior izquierda) propuesto por Carl Woese (parte superior derecha) y árbol de la vida de dos dominios (parte inferior izquierda) mostrando las simbiosis que dieron lugar a las mitocondrias (línea discontinua roja) y los cloroplastos (línea discontinua verde), de acuerdo con la teoría propuesta por Lynn Margullis (parte inferior derecha); (elaboración propia basada en <https://www.rsb.org.uk/biologist-features/going-back-in-genes>).

Los dos primeros, *Bacteria* y *Archaea*, son mayoritariamente unicelulares y carecen de núcleo, esto es son procariotas, pero se diferencian en importantes propiedades químicas, genéticas y metabólicas. El tercer Dominio reúne a todos los organismos eucariotas (que sí tienen núcleo, donde almacenan casi todo el material genético). Pueden ser unicelulares o multicelulares y comprenden seres vivos tan diversos como hongos, protozoos, algas, plantas, insectos, peces, reptiles, aves, animales, seres humanos y un largo etc. Los estudios de Woese permitieron también identificar las principales ramas, esto es los filos o linajes, dentro de dominio. En la raíz del árbol se sitúa LUCA, término acuñado por Woese para designar al antepasado común de todas las células actuales, que apareció en la Tierra hace unos 4000 Ma. Un concepto relacionado con LUCA es FUCA (*First Universal Common Ancestor*), primer antecesor común universal no solo de las células que llegaron a nuestros días, sino también de células primitivas ya extinguidas [27].

Aunque el árbol de Woese ya reflejaba una mayor afinidad de los eucariotas con las arqueas que con las bacterias, los considera sin embargo tan radicalmente diferentes como para separarlos en su propio Dominio. Sin embargo, considerados a la luz de la teoría endosimbiótica de Lynn Margulis [28], el descubrimiento de las arqueas Asgard junto con análisis filogenómicos condujo a la propuesta del árbol de la vida de dos Dominios: *Bacteria* y *Arquea* [29] (Figura 6). Las arqueas Asgard, pertenecientes a un nuevo superfilo, se denominaron así en honor al reino de los dioses nórdicos. Fueron descubiertas en un campo de respiraderos hidrotermales situados entre Groenlandia, Islandia y Noruega en el Atlántico Norte y conocidos colectivamente como Castillo de Loki [30] (Figura 7). El superfilo Asgard contiene los parientes vivos más próximos a los eucariotas actuales, que habrían surgido a partir de una de estas arqueas o de un antepasado suyo, hace 1900-1600 Ma. De hecho, el análisis genómico de las arqueas Asgard reveló la existencia de proteínas que hasta entonces se creía que eran exclusivas de eucariotas y que se utilizaban como marcadores de estos. Entre ellas se incluyen proteínas implicadas en el tráfico de membrana, formación y/o transporte de vesículas, formación del citoesqueleto de actina y la ubiquitina [31]. Aunque la función de estas proteínas en las arqueas Asgard se desconoce, estudios de expresión heteróloga y análisis estructurales de algunas de ellas, como las profilinas y gelsolinas implicadas en la regulación del citoesqueleto de actina, revelaron que son funcionalmente equivalentes a sus homólogas eucariotas y sugieren que la presencia de un citoesqueleto de actina regulado precedió a la eucariogénesis [32].

De acuerdo con la teoría endosimbiótica, una arquea del grupo Asgard habría incorporado una bacteria simbiótica, en concreto un miembro de la clase α del filo *Proteobacteria* (Figuras 6 y 7). Una vez establecida la simbiosis, la bacteria sobrevivió en el interior de la arquea hospedadora, evolucionado con el paso del tiempo hacia el orgánulo que hoy en día conocemos como mitocondria, la diminuta batería que aporta la energía necesaria para la compleja vida eucariota. En consecuencia, los eucariotas no constituyen uno de los linajes originales del árbol de

la vida, sino un descendiente, de indudable importancia, donde confluyeron los dos dominios primordiales. En el origen de los eucariotas se sitúa FECA (*First Eukaryotic Common Ancestor*) que con el tiempo dio lugar a LECA (*Last Eucaryotic Common Ancestor*), el antepasado común de todos los eucariotas que llegaron a nuestros días. Un segundo proceso de endosimbiosis, esta vez entre un descendiente de LECA y una bacteria fotosintética, probablemente un antepasado del actual filo *Cyanobacteria*, dio lugar a los cloroplastos, orgánulos compartidos por algas y por plantas (Figuras 6 y 7).

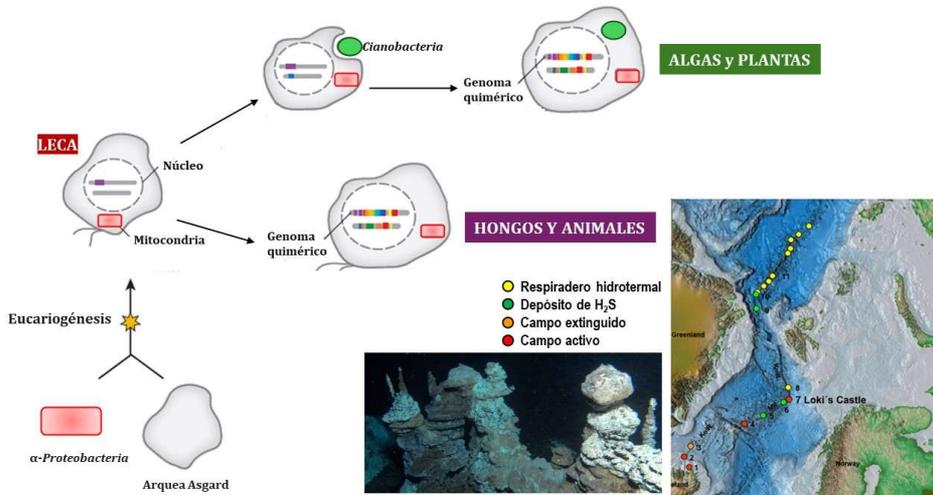


Figura 7. Esquema mostrando el origen de la célula eucariota por simbiosis entre una arquea del superfilo Asgard y las bacterias que dieron lugar a mitocondrias y cloroplastos (modificado de [33]). Las arqueas Asgard fueron descubiertas en los respiraderos hidrotermales conocidos como Castillo de Loki [34].

La fisiología y metabolismo de mitocondrias y cloroplastos, junto con la secuencia de nucleótidos y estructura de sus genomas, avalan la teoría endosimbiótica, existiendo además evidencia de la transferencia de genes de los endosimbiontes al núcleo eucariota. Mientras que el origen bacteriano de mitocondrias y cloroplastos no ofrece lugar a dudas, el origen del núcleo es más difícil de rastrear. Aunque existen otras teorías, recientemente se ha propuesto su posible evolución a partir de antiguas factorías de viriones, compartimentos intracelulares formados dentro de células infectadas que favorecen la replicación del genoma viral y que podrían haber actuado como pseudonúcleos [35] (sección 8.1).

4. Conociendo a LUCA: ¿cuándo, cómo y dónde vivió?

“El presente solo se forma del pasado, y lo que se encuentra en el efecto estaba ya en la causa.”
Henri Bergson (1859-1941)

Como se comentó anteriormente, en la base del árbol filogenético de los modernos organismos celulares, se encuentra LUCA, el hipotético antecesor común

del que desciende toda la vida celular existente hoy en día en el planeta Tierra. Aunque el término fue acuñado por Woese [26], la hipótesis del progenitor común surgió por primera vez en 1859, cuando Charles Darwin publicó “El origen de las especies”, donde sostiene que “... probablemente todos los seres orgánicos que han vivido en esta tierra han descendido de alguna forma primordial, en la que la vida fue inspirada por primera vez” [36] (Figura 8). La existencia del ancestro común, principio fundamental de la teoría evolutiva, se consolidó en los años 1960, cuando se descifró el código genético y se comprobó que era universal [37].

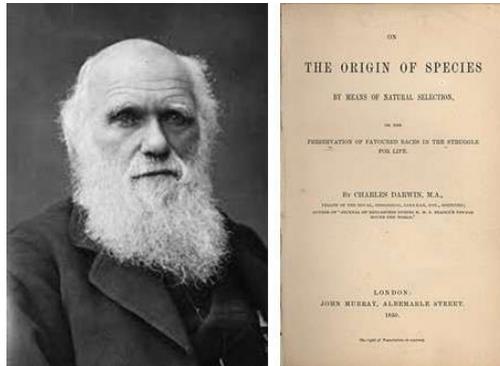


Figura 8. Charles Darwin y “El origen de las especies”.

Obviamente, el conocimiento de cuándo surgió LUCA, y de cómo y dónde vivió, resulta crucial para comprender el origen de la vida celular y su evolución temprana. Teniendo en cuenta que tanto la Tierra como los seres vivos registran su propia historia, las disciplinas encargadas de su estudio, o sea la Geología y la Biología, permiten abordar empíricamente estas cuestiones [25, 38, 39].

4.1. La antigüedad de LUCA

La Geología aporta información sobre el origen de la vida en la Tierra en base a registros químicos (quimiofósiles) y a la detección de microfósiles. Sin embargo, a lo largo del tiempo, la tectónica de placas y la erosión han borrado muchos de los vestigios de la historia temprana del planeta, de modo que las rocas realmente antiguas, que solo alcanzan los 4000 Ma, son sumamente escasas. Aun así, para acceder a periodos más tempranos de la historia de la Tierra se puede recurrir a inclusiones de minerales más antiguos que hayan quedado protegidos en el interior de esas rocas [40].

Los registros químicos que señalan la existencia de vida en la Tierra primitiva derivan en gran medida del estudio de isótopos de carbono en materiales antiguos, teniendo en cuenta que una relación $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ elevada se asocia con la fijación biológica del carbono. De esta manera se aportó evidencia de actividad biológica en rocas sedimentarias de hace 3800 Ma encontradas en Groenlandia [41] e incluso en material aún más antiguo, en concreto grafito preservado en un cristal de zirconio de hace 4100 Ma procedente del oeste de Australia [40]. En lo que se refiere a

microfósiles, los más antiguos conocidos datan de hace 3500 Ma. Fueron descubiertos en los cinturones de rocas verdes de Pilbara y Barberton, localizados en Australia y Sud-África, respectivamente [42, 43]. Su excelente estado de conservación permite identificar restos de microorganismos filamentosos, estromatolitos y biopelículas, asociados a formas de vida tanto quimiotrofas, que obtienen energía a partir de compuestos químicos, como fotótroficas, cuya fuente de energía es la luz del Sol (Figura 9).

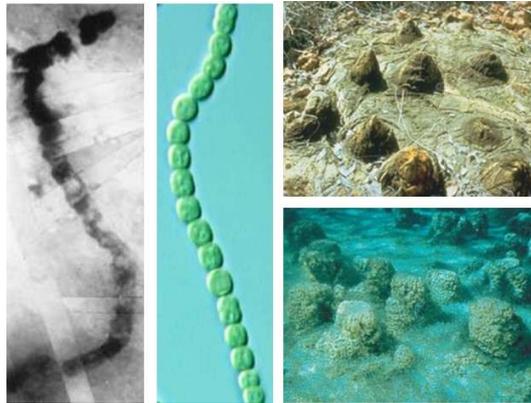


Figura 9. Fósil bacteriano descubierto por J. William Schopf (UCLA) en Australia en rocas de hace 3500 millones de años cuyas células se agrupan en filamentos similares a los de Cianobacterias actuales (parte izquierda y central, respectivamente). Estromatolitos de forma cónica de hace 1600 millones de años encontrados en rocas dolomitas del norte de Australia y estromatolitos actuales (parte superior e inferior derecha, respectivamente; modificado de [44]).

El descubrimiento de estos microfósiles, apoyado también por evidencias isotópicas y organoquímicas, revela ya por entonces la existencia de formas de vida metabólicamente diversas, estructuralmente complejas y ampliamente extendidas. El grado de evolución alcanzado en esos momentos apoya la aparición de LUCA en tiempos aún más remotos.

4.2. ¿Cómo y dónde vivió?

Al igual que la Geología, la Biología registra también su propia historia, que queda impresa en las secuencias de nucleótidos y aminoácidos [25]. Como se comentó anteriormente, ambos tipos de secuencias actúan como testigos de la historia evolutiva, permitiendo establecer las relaciones filogenéticas, esto es el grado de parentesco existente entre los seres vivos. Basados inicialmente en un solo gen (RNAr 16S/18S; [26]), el impresionante avance en las técnicas de secuenciación ocurrido en las últimas décadas permite realizar estudios filogenéticos utilizando genomas completos, no solo uno o unos pocos genes individuales.

En lo que se refiere al origen de la vida, estos estudios pretenden rastrear en genomas de procariotas actuales genes antiguos que pudieran remontarse a LUCA. Las funciones deducidas a partir de ellos describen a LUCA como anaerobio,

dependiente de H₂, fijador de CO₂, o sea autótrofo, y probablemente termófilo [45, 46]. La autotrofia implica la conversión de CO₂ inorgánico en derivados de carbono orgánico que forman parte de la vida. De las seis rutas de fijación del CO₂ conocidas [47], en LUCA solo se detectaron enzimas pertenecientes a la vía del acetil-CoA o vía Wood-Ljungdahl, que a diferencia del resto no es cíclica sino lineal. En esta vía el H₂ reduce al CO₂ dando un grupo metilo (-CH₃) y monóxido de carbono (CO) a través de dos ramas independientes. Ambos compuestos se utilizan para generar acetil-CoA que se incorpora al metabolismo celular en forma de acetato y otros precursores. Además, la producción de acetil-CoA se acopla a la formación de fuerza Na⁺ motriz que se utiliza para la síntesis de ATP. Este último también se genera por fosforilación a nivel de sustrato en la transformación de acetil-CoA en acetato, vía acetilfosfato (Figura 10). Todo ello identifica a LUCA como quimiolitioautótrofo, al utilizar una fuente química de energía (quimiótrofo), en concreto un compuesto inorgánico (H₂; litotrofo) y fijar el CO₂. La idea de que los primeros pobladores de la Tierra fueron quimiolitioautótrofos termófilos, ya había sido propuesta por Mereschkowsky et al. en 1910 (translated into English in [48]) y todavía sigue vigente en la actualidad, apoyada por análisis filogenómicos [45]. Sin embargo, estudios recientes sugieren que LUCA pudo haber también actuado como quimiorganoheterótrofo, utilizando compuestos orgánicos como fuente de energía y de carbono [45]. Esta posibilidad se apoya en la detección de varios de los enzimas implicados en la glucólisis y gluconeogénesis, la vía de las pentosas fosfato y el ciclo de Krebs. Por el contrario, no se encontraron enzimas propios de organismos fotótrofos, que obtienen su energía a partir de la luz del Sol [45].

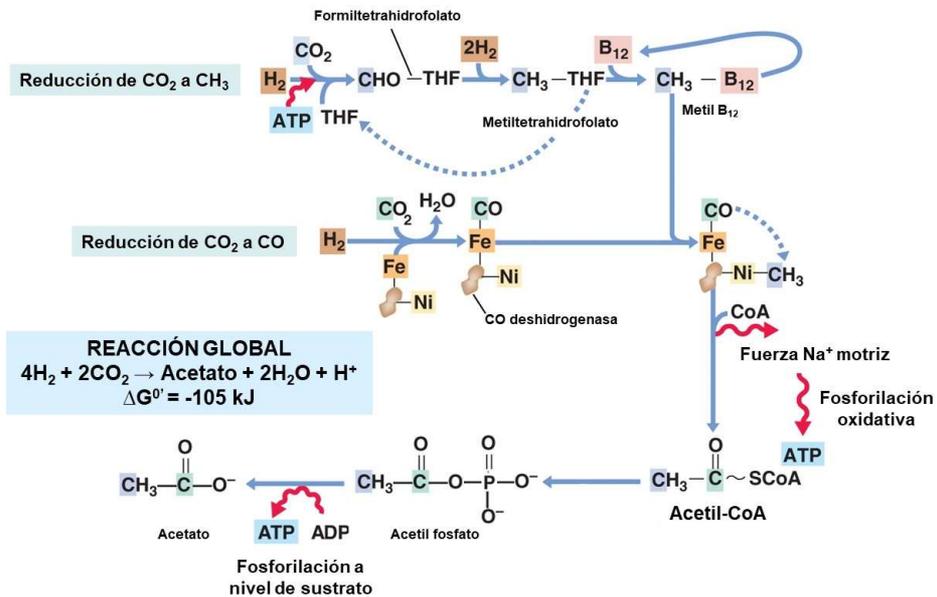


Figura 10. Vía del acetil-CoA o vía Wood-Ljungdahl que LUCA probablemente utilizó para la fijación del CO₂ (modificado de [44]).

En células actuales, la conservación de la energía necesaria para sustentar la vida se consigue gracias al acoplamiento quimiosmótico, mediante ATP sintasas, o mediante fosforilación a nivel de sustrato [49]. En el genoma de LUCA se identificaron genes que codifican enzimas implicados en el metabolismo energético, en concreto subunidades de la ATP sintasa y una fosfotransacetilasa, enzima que cataliza la síntesis de acetilfosfato a partir de acetyl-CoA [50, 51]. Destaca, por el contrario, la ausencia de componentes de una cadena de transporte de electrones encargada de la expulsión de iones. Por ello se ha sugerido que la ATP sintasa de LUCA podría haber aprovechado gradientes geoquímicos naturales de iones, vía H^+/Na^+ antiportadores de membrana, codificados también por su genoma [46].

El análisis de las funciones codificadas por el genoma de LUCA aportó también indicios de la presencia de nitrato y nitrito reductasas, sulfato y sulfito reductasas y fosfosulfato reductasas, así como de numerosos enzimas implicados en la biosíntesis de aminoácidos. Se identificaron, además, genes implicados en la síntesis de peptidoglicano, de lípidos de membrana, en concreto éteres y ésteres lipídicos, así como el gen *merB* que codifica una proteína tipo actina que forma parte del citoesqueleto. Finalmente, se acepta que el material genético de LUCA fue DNA, ya que esto coincide con todos sus descendientes. En su genoma se rastrearon genes que codifican RNAs de transferencia (RNAt) y proteínas ribosómicas, lo que confirma la capacidad de traducir RNA mensajeros (RNAm) utilizando un código genético.

En conjunto, las funciones identificadas sugieren que LUCA fue ya un organismo relativamente complejo, similar a las arqueas y bacterias actuales. Al ser el antecesor común de todas las formas de vida celulares existentes en la actualidad, LUCA es el nodo más antiguo que puede reconstruirse mediante análisis filogenómico. Sin embargo, la información disponible sugiere que LUCA fue el producto de un periodo altamente innovativo de la historia evolutiva de la Tierra y que probablemente formó parte de un ecosistema complejo. De hecho, las reconstrucciones metabólicas indican el potencial de interacción de LUCA con otros procariontes. Si LUCA funcionó inicialmente como quimioautótrofo, en principio podría haber llevado una existencia solitaria, utilizando fuentes abióticas de H_2 y CO_2 . No obstante, es improbable que LUCA haya vivido solo, dado que los compuestos orgánicos resultantes de su autotrofia habrían creado un nicho para el establecimiento de otros metabolismos, permitiendo al propio LUCA actuar como quimioorganoheterótrofo [45]. Los contemporáneos de LUCA habrían sido descendientes ya extinguidos de FUCA, el primer antecesor común de todos los organismos celulares, que por definición escapan al análisis filogenómico.

La inferencia de que LUCA utilizó la vía del acetyl-CoA para la obtención de energía y compuestos orgánicos limita el número de escenarios donde pudo haber existido. Una propuesta atractiva son los sistemas hidrotermales alcalinos del fondo oceánico, donde se genera H_2 mediante reacciones de serpentinización y donde

LUCA habría encontrado protección frente a la radiación UV procedente del Sol (Figura 11).



Figura 11. Vista de la Ciudad Perdida situada en el Atlántico Norte. Se trata de un campo de fumarolas hidrotermales alcalinas, propuestas como lugares apropiados para la vida de LUCA (tomado de Wikipedia).

Las reacciones de serpentinización tienen lugar cuando el agua oceánica, rica en CO_2 , reacciona con las peridotitas, rocas muy antiguas características del manto superior, que pueden aflorar o ascender hacia la superficie. Estas reacciones son fuertemente exotérmicas, provocando un aumento de temperatura, lo cual concuerda con la probable termofilia de LUCA, apoyada por la detección en su genoma del gen que codifica la girasa reversa, enzima característico de los hipertermófilos actuales. Existen evidencias de que las reacciones de serpentinización han tenido lugar en la Tierra desde que apareció el agua líquida. Además, pudieron haber ocurrido en Marte en tiempos pasados y probablemente están ocurriendo hoy en día en Encélado, la luna helada de Saturno, abriendo un camino para la búsqueda de vida extraterrestre. Otros cuerpos celestes que despiertan interés en este sentido son Europa, satélite de Júpiter, y Ceres situado en el cinturón de asteroides entre las órbitas de Marte y Júpiter.

Una posible alternativa como hogar de LUCA sería la superficie oceánica, donde la atmósfera aportaría H_2 derivado de la actividad volcánica o metamórfica, pero donde LUCA quedaría expuesto a la acción letal de la radiación UV. En su genoma se infirió la presencia del gen que codifica un enzima implicado en la reparación de dímeros de timina que se producen en las endosporas de bacterias actuales por acción de la UV. Este enzima, sin embargo, se encuentra también en bacterias que no forman endosporas y en procariotas que no viven en lugares expuestos a la luz del Sol. Por ello, no es un marcador exclusivo de dichos lugares. Otros escenarios propuestos para la aparición de LUCA son los sistemas hidrotermales superficiales y las pozas de marea.

5. La vida después de LUCA

“La unidad es la variedad, y la variedad en la unidad es la ley suprema del universo.”

Isaac Newton (1643-1727)

5.1. Los descendientes de LUCA

Situado en la base del árbol filogenético de los organismos celulares, LUCA fue testigo privilegiado de los albores de la evolución darwiniana que eventualmente condujo a la separación de bacterias y arqueas. A continuación, ambos dominios experimentaron un largo periodo de diversificación metabólica y fisiológica, que permitió explotar en su beneficio los diversos recursos y condiciones aportados por la Tierra primitiva. Durante muchísimo tiempo, el O₂ no estuvo presente en el planeta, al menos en cantidades significativas. Por ello, el metabolismo energético de los primeros procariotas debió ser exclusivamente anaerobio. Además, deberían haber sido resistentes a la temperatura, elevada en la Tierra primitiva.

La búsqueda entre los procariotas actuales de características fenotípicas antiguas, adaptados a las condiciones de la tierra primitiva, sitúan a las bacterias acetogénicas (productoras de acetato; en concreto los clostridios pertenecientes al filo *Firmicutes*) y las arqueas metanogénicas (productoras de metano; filo *Euryarchaeota*), en la base de sus respectivos dominios (Figura 12). Ambas son anaerobias estrictas y quimiolitioautótrofas dependientes del H₂. Se encuentran en una gran variedad de hábitats carentes de O₂ donde abunda el H₂ que utilizan como combustible para la reducción del CO₂ mediante la vía del acetyl-CoA (Figura 10). Entre ellos se incluyen los sedimentos orgánicos del fondo de lagos y océanos, así como el tracto digestivo de animales, que no encajan con las condiciones de la tierra temprana. Sin embargo, aparecen también en la corteza terrestre y en fuentes hidrotermales actuales, que sí pueden considerarse como hábitats primitivos.

Siguiendo la estrategia de búsqueda de fenotipos “antiguos” se propuso que el siguiente grupo metabólico que surgió en la evolución fueron los antepasados de los actuales procariotas reductores del sulfato [52]. Evidencias isotópicas de su actividad remontan su aparición al eón Arcaico, hace al menos 3400 Ma. A nuestros días han llegado bacterias y arqueas reductoras del sulfato anaerobias estrictas, que obtienen energía por respiración anaerobia utilizando este compuesto como aceptor terminal de electrones en su cadena de transporte. Es probable, sin embargo, que el metabolismo energético ancestral de los procariotas reductores del sulfato se basara en la utilización de sulfito o azufre, abundantemente producidos en la Tierra primitiva a consecuencia de la actividad volcánica o hidrotermal. Por el contrario, antes de la aparición del O₂ el sulfato habría sido escaso y localmente limitado. Coincidiendo con el metabolismo antiguo, muchos reductores del sulfato actuales utilizan H₂ como fuente de energía, son autótrofos y fijan el CO₂ utilizando la vía del acetyl-CoA.

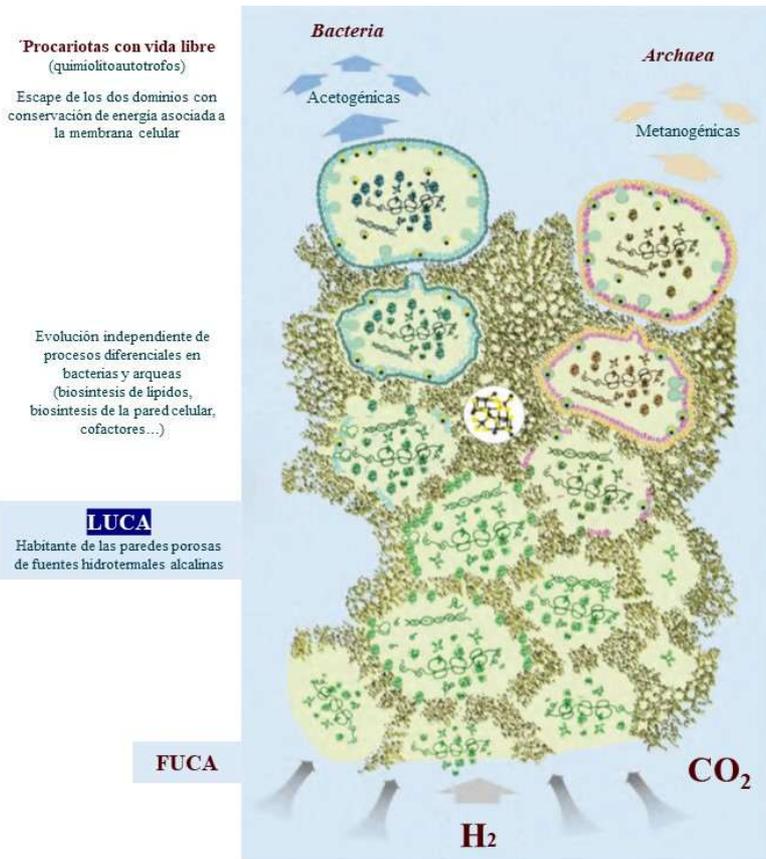


Figura 12. Separación de los dominios *Bacteria* y *Archaea* a partir de LUCA, posible habitante de fuentes hidrotermales alcalinas (modificado de [52]).

Junto con las bacterias acetogénicas y las arqueas metanogénicas, los reductores del sulfato son los habitantes mayoritarios en zonas profundas de la corteza terrestre, donde en la actualidad, al igual que en la Tierra primitiva, los recursos disponibles para la vida son muy limitados [52]. Aunque el rendimiento energético de la vía del acetil-CoA es limitado, la generación simultánea de compuestos orgánicos reduce el coste energético de las reacciones biosintéticas. Además, muchos de los procariontos que la utilizan pueden crecer autotróficamente con CO₂ e H₂, pero también heterotróficamente a partir de una gran variedad de compuestos orgánicos. Esta flexibilidad metabólica es clave para su éxito ecológico actual y pudo haberlo sido también en el pasado.

Aunque actualmente se acepta que tanto LUCA como los linajes iniciales de procariontos fueron quimiótrofos, la capacidad de aprovechar la luz del Sol como fuente inagotable de energía representó un hito clave en la historia evolutiva. Los primeros fotótrofos de la Tierra llevaron a cabo la fotosíntesis anoxigénica que no genera O₂ y cuya aparición podrá haber ocurrido hace 3500 Ma. Este proceso es

realizado por una gran diversidad de bacterias, pertenecientes a numerosos linajes. En su fotosíntesis anoxigénica estas bacterias utilizan compuestos inorgánicos diferentes del H_2O como donadores externos de electrones, principalmente H_2S , pero también S^0 , $S_2O_3^{2-}$, Fe^{2+} y H_2 , combinándola con tres de las seis rutas de fijación del CO_2 conocidas [47]: el ciclo de Krebs reverso, el ciclo del 3-hidroxiacetato y el ciclo de Calvin (o de Calvin-Benson-Bassham). Se ha propuesto que la principal aportación de la fotosíntesis a la evolución fue el aumento de la producción primaria [53]. Antes de ella, el H_2 de origen geoquímico era la única fuente significativa de electrones disponible para la fijación del CO_2 . Se estima que la transición desde la quimiosíntesis basada en el H_2 a la fotosíntesis anoxigénica multiplicó por 2000 la producción primaria anual en la Tierra y que la subsiguiente transición a la fotosíntesis oxigénica, asociada al ciclo de Calvin, supuso un incremento adicional de 30 veces [54]. Así, la fijación fotosintética del CO_2 abrió el camino para la diversificación del metabolismo quimioorganoheterótrofo en procariotas y su posterior adopción por eucariotas.

A pesar del hito evolutivo que supuso la aparición de la fotosíntesis anoxigénica, fue la fotosíntesis oxigénica, asociada al ciclo de Calvin, la que revolucionó la química de la Tierra. Se calcula que esta surgió hace 3400-2900 Ma, cuando el linaje bacteriano de las cianobacterias consiguió utilizar el H_2O como agente reductor en la fotosíntesis liberando O_2 como producto de deshecho (Figura 13).

Cabe destacar que la fotosíntesis oxigénica apareció en la Tierra mucho antes de que el O_2 alcanzara en la atmósfera niveles significativos (Figura 3). Durante ese tiempo, el O_2 liberado no se pudo acumular, al reaccionar espontáneamente, entre otros, con minerales de hierro reducido (Fe^{2+}) presentes en los océanos, para formar óxidos de hierro (Fe^{3+}). Estos últimos constituyen un marcador prominente en el registro geológico. Los óxidos de hierro son insolubles en H_2O precipitando en los océanos para situarse en el fondo, dando lugar a rocas laminadas sedimentarias constituidas por depósitos alternantes de materiales de hierro Fe^{3+} y sílice, conocidas como bandeado de hierro (Figura 13). Solo cuando se consumió el Fe^{2+} a través de su oxidación por el O_2 , pudo este último acumularse en la atmósfera terrestre y no fue hasta hace unos 600 Ma cuando alcanzó el nivel actual del 21%.

El cambio gradual de la atmósfera de la Tierra, de anaerobia a aerobia, exigió un gran esfuerzo de adaptación por parte de las formas de vida existentes. Las bacterias y arqueas que no consiguieron adaptarse se extinguieron o quedaron relegadas a hábitats anóxicos, debido no solo a la toxicidad del O_2 sino también a la oxidación química de los compuestos inorgánicos reducidos que eran la base de su metabolismo energético quimiolitotrofo. Así, la liberación de O_2 en la fotosíntesis oxigénica podría haber causado la mayor conmoción que haya ocurrido jamás en la biosfera. Por otro lado, sentó el escenario para la evolución de nuevas formas de vida centradas en la obtención de energía por oxidación de compuestos químicos, inorgánicos y orgánicos, en el proceso de respiración aerobia. Los procariotas que

adquirieron la capacidad de respirar O_2 lograron una enorme ventaja energética, asociada al elevado potencial de reducción del par O_2/H_2O , lo que justifica su éxito evolutivo. Estos procariotas desarrollaron distintos mecanismos de protección frente a los derivados tóxicos generados durante la reducción del O_2 a H_2O en la respiración aerobia. Se trata del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y del anión superóxido (O_2^-), que son detoxificados por acción de enzimas como la catalasa, la peroxidasa o la superóxido dismutasa.

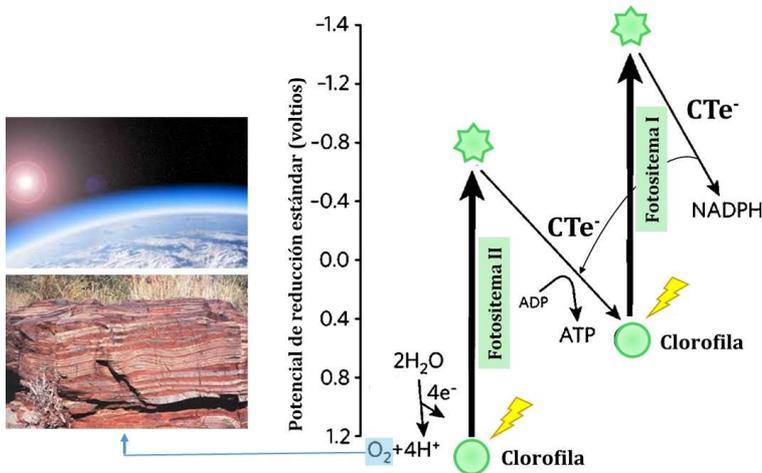


Figura 13. Fotosíntesis oxigénica (derecha; modificado de [55]) mostrando dos consecuencias de la liberación de O_2 : formación del bandeo de hierro (parte inferior izquierda; tomado de <https://www.geologyin.com/2015/03/banded-ironstone-formation-theory.html>) y de la capa de ozono (parte superior izquierda; tomado de <https://www.envinsci.co.uk/why-does-no-one-talk-about-the-ozone-layer-anymore/>).

Junto con la evolución de la respiración aerobia, otra consecuencia importantísima de la acumulación del O_2 en la atmósfera de la Tierra fue la formación de la capa de ozono (O_3) que absorbe la intensa radiación UV procedente del Sol, protegiendo la superficie de la tierra de su acción letal para los seres vivos (Figura 13). Antes de la formación de la capa de ozono, la vida debió estar probablemente confinada a lugares protegidos frente la radiación UV.

Con el tiempo, la fotosíntesis oxigénica y la respiración aerobia, adoptadas tanto por procariotas como por eucariotas, alcanzaron un equilibrio natural, llegando a dominar un planeta enriquecido en O_2 y desempeñando un papel central en el ciclo del carbono.

5.2. LECA y sus descendientes

A pesar de las aportaciones de la teoría endosimbiótica y del descubrimiento de las arqueas Asgaard a la comprensión del origen de la célula eucariota (Figuras 6 y 7), varios aspectos de este proceso continúan siendo un enigma. Sin embargo, tanto el conocimiento de LECA, antecesor común de todos los eucariotas actuales, como el

de sus descendientes ha aumentado considerablemente en los últimos años, gracias a su exhaustivo muestreo y al análisis filogenómico. Al igual que en el caso de LUCA, la información existente indica que LECA era ya un organismo altamente complejo caracterizado por poseer, además de mitocondrias, núcleo y poros nucleares, cromosomas lineales con telómeros, genes con intrones junto con la maquinaria de corte y empalme, otros mecanismos de procesamiento del RNA, lípidos de tipo bacteriano, un elaborado sistema de endomembranas, incluyendo el aparato de Golgi, endosomas, lisosomas y peroxisomas, y un sofisticado ciclo celular [56, 57]. Se pudo predecir, además, que el proteoma de LECA incluía ya unas 10.000 proteínas [58]. En base a ello se acepta que antes de LECA, cuya aparición se remonta al eón Proterozoico, hace 1900-1600 Ma (Figura 3), tuvo que transcurrir cierto tiempo durante el cual habrían evolucionado formas unicelulares eucariotas, que posteriormente se extinguieron sin dejar rastro [59]. Tanto LECA y sus descendientes como las formas ya extinguidas derivan de FECA (*First Eukaryotic Common Ancestor*), el antecesor común de todos los eucariotas.

La integración de datos relativos a registros fósiles, biomarcadores orgánicos, cronómetros moleculares, filogenias y aproximaciones redox, sugieren que los eucariotas ya se habían establecido en los ecosistemas del Proterozoico y que eran probablemente aerobios. De hecho, la evolución de la compleja vida eucariota se asocia en el tiempo con el incremento del O₂ en la Tierra. Esto sugiere una relación causa/efecto derivada del elevado rendimiento energético de la respiración aerobia realizada por las mitocondrias, necesario para sustentar la compleja vida eucariota [59]. Así, la capacidad generadora de energía de las mitocondrias impartió un nuevo rango de propiedades a las células eucarióticas, destacando, entre muchas otras, su sofisticado desarrollo multicelular y, por extensión, una complejidad morfológica, estructural y de comportamiento sin parangón en el mundo procariota. En cuanto a los eucariotas actuales, su exhaustivo muestreo y análisis filogenómico reveló que la mayoría de los descritos formalmente son predominantemente multicelulares y pertenecen a dos super-grupos filogenéticos: *Archaeplastida* (algas y plantas) y *Opisthokonta* (hongos y animales). Sin embargo, la mayor diversidad se asocia con formas unicelulares, en concreto con algas y con el cajón de sastre que suponen los antiguos “protistas” [32, 56].

5.3. Los límites de la vida

“Quien no ha afrontado la adversidad no conoce su propia fuerza.”
Benjamin Jonson (1572-1637)

Los procariotas, descendientes directos de LUCA, han dominado la mayor parte de la historia evolutiva de la Tierra, consiguiendo ocupar virtualmente cualquier lugar donde exista agua en estado líquido [60]. Se encuentran en hábitats “normales”, con condiciones ambientales consideradas “favorables” para la vida, donde conviven con plantas y animales a los que además colonizan. Sin embargo, aparecen también en lugares generalmente prohibidos para los organismos

superiores, debido a sus condiciones “extremas”. Los seres vivos que habitan en esas condiciones se denominan “extremófilos” o “poliextremófilos”, en base a su dependencia de una o más de ellas. Hay que tener en cuenta que estos términos tienen una fuerte carga antropocéntrica, no microbiana [61]. De hecho, en la Tierra existen miles de lugares que presentan valores extremos para uno o más parámetros físico-químicos como temperatura, pH, presión, concentración salina, radiación, o caracterizados por la escasez de humedad y nutrientes (Figura 14). Sorprendentemente, también se han encontrado procariotas en las zonas altas de la atmósfera, donde la radiación ultravioleta es elevada, e incluso en reactores nucleares.



Figura 14. Ejemplos de ambientes extremos, mostrando (de izquierda a derecha): océano Antártico, parque de Yellowstone (con temperaturas muy bajas y muy altas), mina de Riotinto (pH muy ácido), fosa oceánica (elevada presión), mar Muerto (elevada salinidad) y desierto de Atacama (lugar más seco del planeta).

En base a ello, los extremófilos, y especialmente los poliextremófilos, podrían ser las formas de vida dominantes en nuestro planeta [62]. Además, considerando que las condiciones que imperan actualmente en la superficie terrestre solo han existido durante un breve periodo de tiempo, en comparación con el tiempo de existencia de la vida, se puede concluir que el modo de vida (poli)extremófilo ha dominado la historia evolutiva de la Tierra [63]. Por ello, lejos de ser algo anecdótico, los (poli)extremófilos son una pieza clave en el puzle de la vida, que permite establecer sus límites para definir el “espacio habitable” [64]. En base a la información existente sobre procariotas cultivables, estos límites se sitúan entre -15°C y 122°C para la temperatura, de $-0,06$ a $12,5$ para el pH, en más de 1000 atmósferas de presión y en 35% de salinidad [60]. Hay que considerar, además, las interacciones abióticas entre distintos factores que en muchos casos determinan la habitabilidad. Destaca en este sentido el aumento de la temperatura de ebullición del agua con la presión o la disminución del punto de congelación con la salinidad. Por ello, la ventana de la vida se amplía bajo determinadas combinaciones de agentes estresantes, explicando el predominio de los poliextremófilos sobre los extremófilos. Cabe destacar que estos procariotas no solo toleran las condiciones

consideradas extremas, sino que las requieren para vivir y que, gracias a ellos, la esterilidad, o sea la ausencia de vida, en muestras naturales es sumamente rara.

Los extremófilos cuentan con diferentes adaptaciones genéticas y bioquímicas. Las respuestas bioquímicas a condiciones estresantes individuales han sido ampliamente estudiadas, revelando diversos mecanismos activos y pasivos. Entre ellos se incluyen la alteración en la composición de los lípidos de membrana, la producción de enzimas estables bajo dichas condiciones o la acumulación intracelular de solutos. De acuerdo con ello la vida poliextremófila podría verse facilitada por la regulación de la concentración de solutos e iones intracelulares, combinada con la modificación de la membrana y de la pared celular.

6. Evolución mediante adaptación

“Los humanos [...] piensan en muchas cosas, pero las bacterias solo piensan en una: sobrevivir.”
Gary French

Trabajando conjuntamente, la mutación y la transferencia genética horizontal (o lateral) son importantes fuentes de variabilidad en procariotas, responsables de la plasticidad de sus genomas que constituye la base de su supervivencia. Las nuevas variantes generadas por estos mecanismos quedan sometidas a la acción de la selección natural. Las propiedades beneficiosas adquiridas permiten a los procariotas adaptarse a condiciones ambientales cambiantes y explotar fácilmente cualquier hábitat, ya sea “normal” o “extremo”, pudiendo colonizar también a otros seres vivos.

6.1. El valor de ser pequeño: mutación y reproducción

“La verdad es compleja, pero a lo complejo solo se llega a través de lo simple.”
Autor desconocido

Existe una especie de leyenda negra sobre las bacterias, que algunos consideran poco interesantes y por tanto aburridas. Esta consideración deriva en gran medida de su pequeño tamaño, que determina además su simplicidad morfológica y estructural (Figura 15). Sin embargo, el pequeño tamaño, no solo de las bacterias sino también de las arqueas, oculta una increíble complejidad genética, metabólica y fisiológica. Por otro lado, el pequeño tamaño confiere importantes ventajas a los procariotas, siendo en gran parte responsable de su éxito evolutivo.

Las células pequeñas tienen una mayor relación superficie/volumen que las grandes. Por ello presentan una tasa más alta de incorporación de nutrientes (y también de excreción de residuos) por unidad de volumen celular, haciendo que su metabolismo sea más eficaz. Esto se traduce en una elevada tasa de crecimiento y reproducción. Así, para una determinada cantidad de nutrientes, las células pequeñas darán lugar a un mayor número de descendientes que las células grandes (Figura 16).

Cada vez que una célula se reproduce, su cromosoma se replica. Durante la replicación pueden generarse errores ocasionales, denominados mutaciones. Dado que la tasa de mutación es similar para todas las células, ya sean pequeñas o grandes, cuantas más veces se replique el DNA mayor será el número de mutaciones acumuladas en la descendencia. Las mutaciones son el sustrato “crudo” de la evolución. Cuanto mayor sea su número mayores serán las opciones que quedarán sometidas a la selección natural, imponiéndose aquellas que confieran un beneficio (Figura 16). Además, las células procariontas son haploides, permitiendo que los fenotipos conferidos por las mutaciones se manifiesten directamente. Esto no siempre ocurre en células eucariotas que son mayoritariamente diploides.

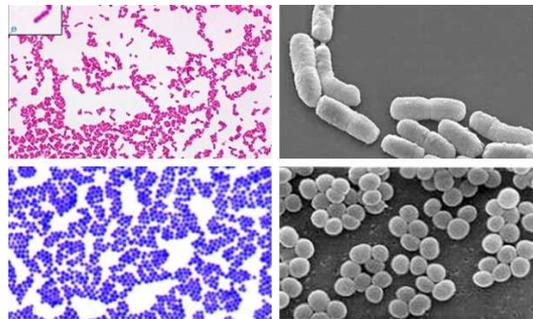


Figura 15. *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* visualizados por microscopía óptica (tinción Gram) y microscopía electrónica de barrido (micrograffas en blanco y negro). *E. coli* tiene morfología bacilar, con tamaño de 1 x 2 μm y es Gram negativa (células de color rosa; tomado de <https://microbe-canvas.com/specsearch.php#specsearch>). *S. aureus* presenta forma redonda con diámetro de 0,8-1,5 μm y es Gram positiva (células de color azul; tomado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470553/figure/article-22388.image.f1/>).

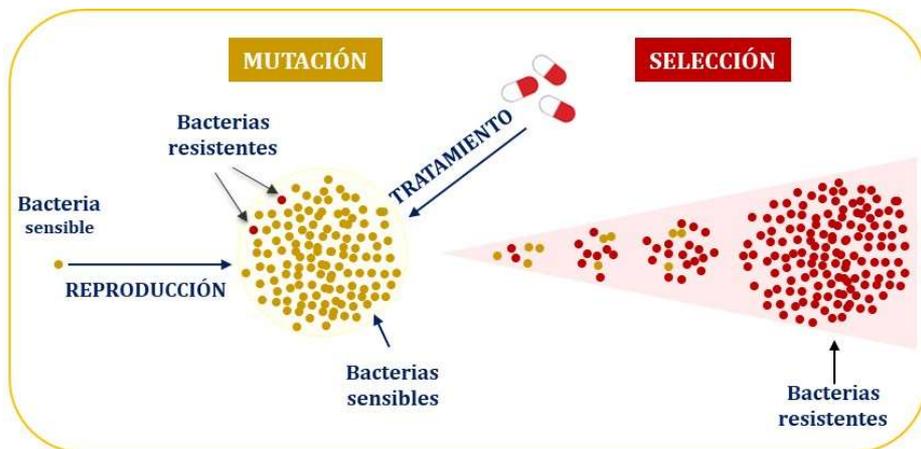


Figura 16. Mutación como fuente de variabilidad genética que quedará sometida a la acción de la selección natural. Como ejemplo se utiliza la rápida evolución de resistencia a los antibióticos (modificado de <https://www.reactgroup.org/>).

6.2. Transferencia genética horizontal

“Necesitamos diversidad en el mundo para enfrentar los nuevos desafíos.”

Tim Berners-Lee (1955)

Típicamente, los seres vivos transmiten la información genética de manera vertical, desde los progenitores a sus descendientes. Sin embargo, el DNA puede también transferirse de forma horizontal, procedente de fuentes distintas a los progenitores. La transferencia genética horizontal es particularmente relevante en procariontes, donde existe un enorme reservorio de genes adaptativos que pueden ser movilizados entre los miembros de la misma especie o de especies diferentes, incluso entre grupos filogenéticos muy distantes. Se calcula que del 10% al 20% de los genes codificantes de proteínas de genomas procariontes han sido adquiridos por transferencia horizontal [65]. La movilización horizontal de material genético ocurre mayoritariamente mediante los mecanismos de transformación (incorporación de DNA exógeno procedente del medio), conjugación (transferencia de DNA por contacto directo célula-célula) y transducción (transferencia de DNA mediada por virus) ([66-69]; Figura 17).

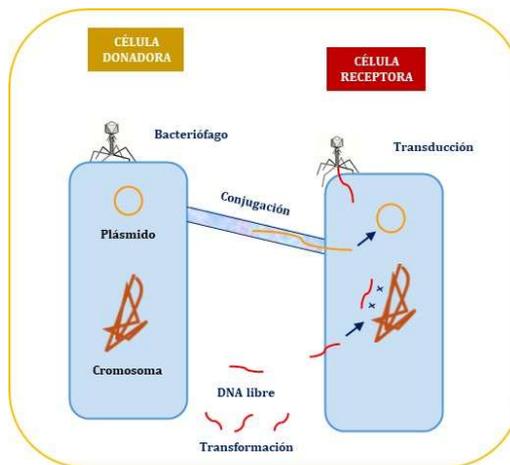


Figura 17. Principales mecanismos de transferencia genética horizontal en procariontes. XX, incorporación del DNA exógeno por recombinación homóloga, en concreto mediante un doble sobrecruzamiento (modificado de [70]).

En la transferencia horizontal participa un inmenso arsenal de elementos genéticos potencialmente móviles. Algunos, como los transposones, los pseudo-transposones, las secuencias de inserción y el sistema integrón/casete génica, mueven DNA dentro de la misma célula. Otros transportan DNA de una célula a otra, como es el caso de los elementos integrativos y conjugativos, los elementos integrativos y movilizables, los plásmidos y también los virus. A su vez, los integrones pueden formar parte de transposones y los integrones, las secuencias de inserción y los transposones pueden localizarse tanto en el cromosoma como en plásmidos (Figura 18).

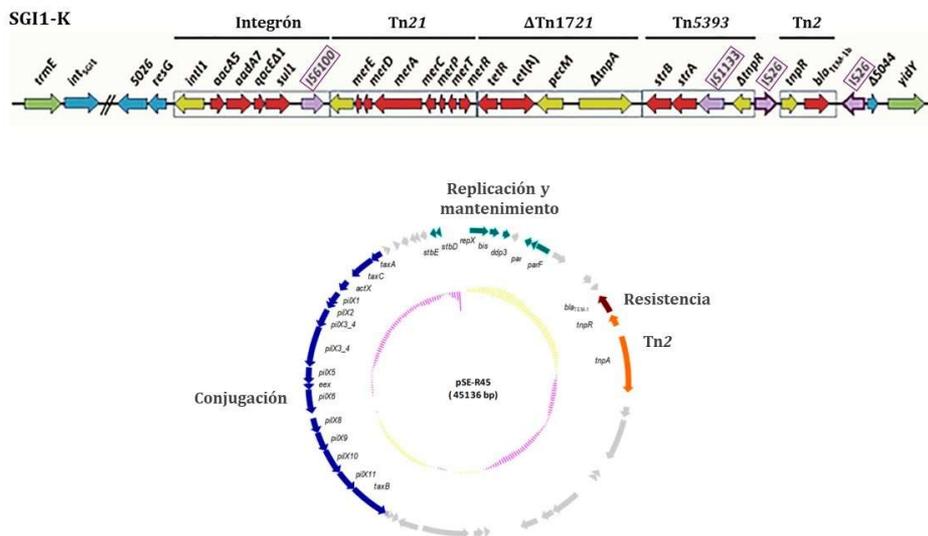


Figura 18. Ejemplos de elementos genéticos móviles. SG11-K (parte superior), elemento integrativo y movilizable de *Salmonella enterica* serotipo Kentucky. Se trata de un mosaico de elementos genéticos potencialmente móviles que aportan múltiples genes de resistencia. Tn, transposón ([71]. pSE-R45 (parte inferior), plásmido conjugativo de *S. enterica* serotipo Enteritidis portador del gen *bla*_{TEM-1} que confiere resistencia a ampicilina aportada por el transposón Tn2 [72]]..

Los plásmidos son elementos genéticos extracromosómicos, formados por DNA normalmente circular con capacidad de replicación autónoma, que no codifican funciones esenciales para las bacterias que los poseen, pero pueden conferir importantes ventajas adaptativas [73]. Se encuentran ampliamente distribuidos en procariontes y muchos tienen la capacidad de dispersarse mediante transferencia horizontal, gracias a los procesos de conjugación o movilización.

En base a su contenido genético, la adquisición por transferencia horizontal de un plásmido o también de determinadas regiones cromosómicas, como los elementos integrativos conjugativos o movilizables, logra alterar drásticamente el fenotipo de una bacteria, transformándola, por ejemplo, de no patógena en patógena o de sensible a determinados antibióticos a resistente a ellos (Figura 16). Así, los elementos genéticos móviles, actuando de manera individual o en combinación, ejercen un profundo impacto en la capacidad de adaptación de los procariontes. Además, sus efectos se extienden a otros muchos ámbitos, afectando también a organismos superiores (como plantas, animales y seres humanos), al medio ambiente y a la industria. De hecho, numerosas propiedades de interés clínico, ecológico y económico, relacionadas no solo con patogenicidad y resistencia sino también con metabolismo, biorremediación o simbiosis, son codificadas y transferidas por elementos genéticos móviles [74]. Por otro lado, dichos elementos pueden mediar reorganizaciones genómicas, ocasionando pérdida de genes, duplicaciones, inversiones y translocaciones de gran relevancia en la evolución.

En resumen, se puede decir que los procariotas, considerados de manera individual poseen una capacidad de adaptación limitada, ya que sus pequeños genomas carecen del enorme repertorio de genes accesorios cuyas funciones serían necesarias para afrontar nuevos retos. Sin embargo, a nivel de población y comunidad, destaca su sorprendente capacidad de adaptación, que descansa en su elevada tasa de reproducción y en el inmenso arsenal de genes adaptativos que pueden ser movilizados por transferencia horizontal, formando parte del genoma flotante. Esto tiene como consecuencia el sacrificio de la individualidad a favor del conjunto. Los eucariotas, por el contrario, manifiestan un estilo único de individualidad, favoreciendo la transferencia vertical sobre la promiscuidad asociada a la transferencia horizontal común en procariotas.

6.3. El poder de las simbiosis

“El trabajo en equipo divide el trabajo y multiplica los resultados.”
 Autor desconocido

El término simbiosis procede del griego y significa “vida en común”. Fue introducido por el botánico alemán Anton de Bary (1881-1888) en 1879 para describir cualquier interacción entre dos (o más) organismos en la cual al menos uno de ellos resulta beneficiado [75] (Figura 19).

La definición de Anton de Bary engloba tres tipos de interacciones entre un simbiote y un hospedador: el mutualismo, en el que ambos miembros se benefician de la asociación; el comensalismo, en el que un miembro se beneficia mientras que el otro ni se beneficia ni se perjudica; y el parasitismo, en el que un miembro se beneficia perjudicando al otro (Figura 19).



Figura 19. Principales tipos de simbiosis, término introducido por Anton de Bary (izquierda) con ejemplos relevantes de mutualismo (gusanos tubícolas que viven en chimeneas negras asociados con bacterias quimiolitotrofas oxidantes del azufre y pulgones que establecen simbiosis obligada con bacterias que aportan al insecto aminoácidos esenciales) y parasitismo (invasión de células intestinales humanas por *Escherichia coli*, actuando como bacteria patógena causante de enfermedad y depredación de *E. coli* por *Myxococcus xanthus*); (modificado de [76]).

A pesar de la utilidad de estos términos, es importante destacar que las simbiosis comprenden un gradiente continuo de interacciones, que se extiende desde el parasitismo, cuya manifestación extrema es la depredación, hasta el mutualismo, situándose el comensalismo entre ellos [76]. Además, estas relaciones no son inmutables y se sabe que numerosos mutualistas han evolucionado a partir de parásitos y que los parásitos pueden evolucionar a mutualistas. Será en el mutualismo y en el parasitismo donde nos centraremos a continuación.

6.3.1. Mutualismo

Las simbiosis surgieron a raíz de la diversificación de la vida, aportando una vía de innovación implicada en algunas de las transiciones de mayor importancia que ocurrieron a lo largo de la historia evolutiva. Como paradigma basta recordar el papel de las simbiosis en el origen de la célula eucariota (Figuras 6 y 7). Otros ejemplos de especial interés son las simbiosis mutualistas que se establecen entre *Rhizobium* y plantas leguminosas, donde la bacteria aporta la capacidad de fijar N_2 atmosférico para su utilización como fuente de nitrógeno celular por parte de la planta [77]; o entre bacterias y animales que confieren a estos la propiedad de emitir luz, conocida como bioluminiscencia [78].

Tanto la fijación del N_2 como la bioluminiscencia son procesos antiguos, que surgieron en una época temprana de la historia evolutiva. El primero se remonta probablemente a los descendientes directos de LUCA, que existieron en un mundo pobre en nitrógeno combinado. De hecho, la fijación del N_2 en vida libre se encuentra ampliamente extendida entre las bacterias acetogénicas y las arqueas metanogénicas actuales, los parientes más próximos de LUCA que llegaron a nuestros días (apartado 5.1.).

El N_2 es el componente más abundante en la atmósfera terrestre, donde representa el 78%. Sin embargo, ningún ser vivo puede utilizar nitrógeno molecular directamente como fuente de nitrógeno celular. De hecho, todos los seres vivos dependen de la disponibilidad de nitrógeno combinado, siendo este el principal factor limitante para el desarrollo de las plantas. De ahí la importancia de la fijación biológica del nitrógeno, esto es de la conversión de N_2 en NH_3 , proceso realizado exclusivamente por un reducido número de procariotas. En concreto solo algunas arqueas metanogénicas, anaerobias estrictas, y determinadas bacterias pertenecientes a los filos *Cyanobacteria*, *Actinobacteria* y *Proteobacteria*, son diazotrofas. El término azoe significa inerte, sin vida, nombre dado por Antoine Lavoisier (1743-1794) a la molécula de dinitrógeno (N_2), haciendo alusión a su elevada estabilidad.

Las bacterias diazotrofas pueden fijar el N_2 no solo en vida libre, sino también en asociación y en simbiosis con plantas. En vida libre, las bacterias fijan N_2 para su propio uso o lo liberan al medio donde quedará disponible para otros organismos. En la fijación asociativa, los diazotrofos viven en la superficie o en los espacios

intersticiales de plantas, mientras que en la relación simbiótica se sitúan en estructuras especializadas como, por ejemplo, los nódulos cuya formación induce *Rhizobium* en las raíces de plantas leguminosas (Figura 20). En ambos casos, las bacterias utilizan productos derivados de la fotosíntesis de las plantas como nutrientes para obtener la elevada cantidad de energía necesaria para la fijación [77].

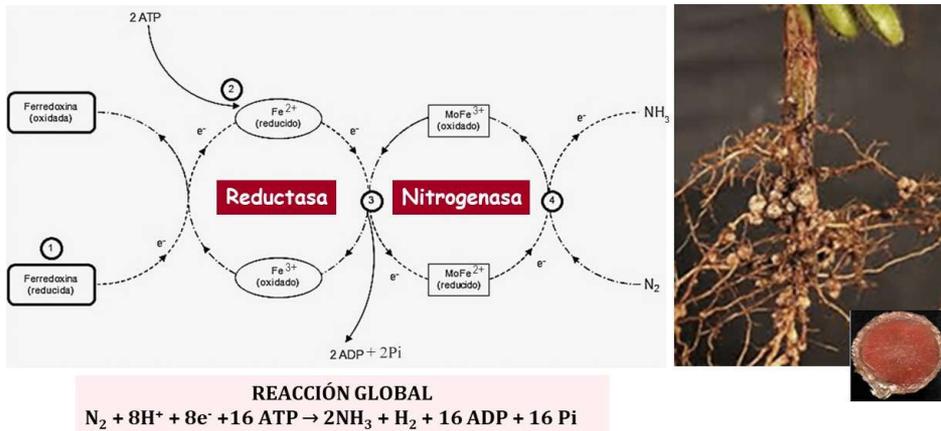


Figura 20. Fijación biológica del nitrógeno. Actuación del complejo enzimático de la nitrogenasa y reacción global del proceso. Por cada electrón aportado por la reductasa a la nitrogenasa se consumen dos moléculas de ATP. La reducción de N_2 a NH_3 implica la transferencia de seis electrones. Además, en la reacción se genera una molécula de H_2 como subproducto, utilizándose los dos electrones adicionales. Esto supone un gasto energético total de 16 moléculas de ATP (izquierda; modificado de <https://fisiolvegetal.blogspot.com/2012/10/fijacion-biologica-de-nitrogeno.html?view=flipcard>). Nódulos formados por *Rhizobium* en la raíz de una planta leguminosa y sección transversal de uno de ellos donde se observa el color rojo debido a la producción de leghemoglobina (derecha; modificado de <https://fisiolvegetal.blogspot.com/2012/10/fijacion-biologica-de-nitrogeno.html?view=flipcard>).

La fijación biológica del N_2 es realizada por el complejo enzimático de la nitrogenasa, compuesto por dos metaloproteínas, la dinitrogenasa reductasa y la dinitrogenasa propiamente dicha. La primera aporta los electrones requeridos por la segunda para la transformación de N_2 en NH_3 (Figura 20). El complejo enzimático de la nitrogenasa está altamente conservado en procariontes. Se piensa que surgió en el dominio *Bacteria*, en un momento temprano del proceso evolutivo, siendo después adquirido por las arqueas mediante transferencia genética horizontal. De acuerdo con su aparición temprana, los dos componentes del complejo son altamente sensibles al O_2 , inactivándose de manera rápida e irreversible en su presencia. Sin embargo, la fijación del N_2 puede ocurrir tanto en ausencia como en presencia de O_2 . Esto se debe a que las bacterias que fijan N_2 en aerobiosis han desarrollado mecanismos de protección del complejo enzimático. Un ejemplo es la leghemoglobina, proteína similar a la hemoglobina de la sangre, sintetizada en los nódulos generados por *Rhizobium* en las raíces de plantas leguminosas (Figura 20). Su función es secuestrar O_2 liberándolo solo a medida que es requerido por la

bacteria para generar, por respiración aerobia, la energía requerida en la reacción de fijación.

La importancia de una fuente de nitrógeno combinado para el crecimiento de las plantas llevó al desarrollo de un proceso de fijación química del N_2 en NH_3 , para la utilización de este último como fertilizante. Dada la estabilidad del N_2 , la reacción implicada: $N_2 + 3H_2 \rightarrow 2NH_3$, requería, además de un catalizador de hierro, 300 atmósferas de presión y $500^\circ C$ de temperatura, con el elevado coste que ello supone. Este proceso, llevado a cabo de manera natural por procariontes, con mucho menor coste para nosotros, fue ideado por Fritz Haber (1868-1934), que recibió el Premio Nobel de Química en 1918.

La bioluminiscencia, por su parte, se piensa que surgió en el dominio *Bacteria* como mecanismo de detoxificación a raíz de la aparición del O_2 en la Tierra. Este proceso está catalizado por el enzima luciferasa, que utiliza como sustratos un aldehído de cadena larga conocido como luciferina (RCHO), flavina mononucleótido reducido (FMNH₂) y O_2 (Figura 21). En la oxidación del aldehído al ácido correspondiente se forma un derivado excitado, muy inestable, del FMNH₂, que vuelve al estado normal liberando el exceso de energía en forma de luz azul ($\lambda = 490 \text{ nm}$).



Figura 21. Bioluminiscencia. Reacción catalizada por el enzima luciferasa (izquierda; modificado de https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/File:Luciferase_reaction.png). Emisión de luz por *Aliivibrio fischeri* en vida libre (parte superior derecha; <https://www.instructables.com/Glowing-Bacteria-Ceparium/>) y en simbiosis con el calamar hawaiano *Euprymna scolopes* (parte inferior derecha; <https://featuredcreature.com/hawaiian-bobtail-squid-and-its-crazy/>).

La actividad protectora de la bioluminiscencia se asocia al elevado consumo de O_2 , cuyos derivados resultaban tóxicos para las formas de vida temprana. Al desaparecer esta necesidad, gracias a la evolución de enzimas detoxificantes, la bioluminiscencia se mantuvo en diversas bacterias, principalmente marinas y pertenecientes a los géneros *Photobacterium*, *Aliivibrio* y *Vibrio* del filo

Proteobacteria. Aunque la función actual de la bioluminiscencia en bacterias se desconoce, la capacidad de emitir luz fue adquirida por organismos superiores que, bien en vida libre o bien en simbiosis con bacterias, utilizan este proceso como medio de comunicación intra e interespecífica, para atraer al sexo opuesto, para atraer a las presas o para ahuyentar a los depredadores.

6.3.2. Parasitismo

Dentro del gradiente de simbiosis, en el lado opuesto al mutualismo se sitúa el parasitismo, cuya manifestación extrema es la depredación (Figura 19). Un ejemplo relevante de parasitismo es la relación que se establece entre *Agrobacterium tumefaciens* y plantas dicotiledóneas, causando la enfermedad de la agalla del cuello [79, 80] (Figura 22).



Figura 22. Plásmido Ti (inductor de tumores) de *Agrobacterium tumefaciens*, portador del DNA-T que es transferido desde la bacteria al núcleo de la célula vegetal (izquierda; modificado de https://en.wikipedia.org/wiki/Ti_plasmid). Tumor originado por *A. tumefaciens* en la base del tallo de plantas dicotiledóneas, característico de la enfermedad de la agalla del cuello (derecha; tomado de <https://ag.umass.edu/landscape/fact-sheets/crown-gall>).

En esta espectacular simbiosis la bacteria aporta a la planta nueva información genética, mediante un proceso de transferencia horizontal. El DNA transferido o DNA-T, procedente del plásmido Ti (inductor de tumores), contiene genes tumorales y genes para la síntesis de compuestos orgánicos muy poco frecuentes en la naturaleza (Figura 22). Se trata de las opinas (derivados de aminoácidos) y las agrocinopinas (azúcares fosforilados), que solo *Agrobacterium* puede utilizar como fuentes de energía y carbono y, en algunos casos, también como fuente de nitrógeno. La integración del DNA-T en el genoma de la planta transforma las células normales en células tumorales, convirtiéndolas en fábricas destinadas a la producción de nutrientes útiles para la bacteria. Estamos ante un claro ejemplo de Ingeniería Genética natural, muy anterior a la Ingeniería Genética artificial ideada por el hombre, cuya puesta a punto y aplicación tuvo lugar a partir de mediados de la década de 1970 (apartado 8.1.). Además, *A. tumefaciens* se ha convertido en la principal herramienta para la manipulación genética de plantas [79, 80].

6.3.3. Patogenicidad, virulencia y enfermedades infecciosas

“La enfermedad es el tirano más temible.”

Albert Camus (1913-1979)

Los parásitos que causan enfermedad se denominan patógenos, siendo la virulencia el grado de patogenicidad. Por ejemplo, *A. tumefaciens* es una bacteria patógena de plantas. Existen otros muchos microorganismos patógenos que establecen una relación de parasitismo no solo con plantas, sino también con animales y seres humanos, causando enfermedad. Estas enfermedades, denominadas infecciosas, constituyen una causa importante de morbilidad y mortalidad en seres humanos. Tristemente famosas son, por ejemplo, la peste, la sífilis, el cólera, la difteria, la lepra o la tuberculosis, de origen bacteriano, así como la viruela, la poliomielitis, el sarampión, la gripe, el SIDA (síndrome de inmunodeficiencia adquirida) o la COVID-19, causadas por virus. Muchas de ellas han originado a lo largo de la historia pandemias y epidemias cuyo impacto sobre la salud tuvo a la vez enormes repercusiones sociales, políticas y económicas (Figura 23).

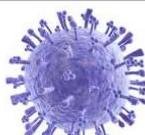
PERIODO	PANDEMIA	PATÓGENO	VARIEDAD	MUERTES
541-549	Peste de Justiniano	<i>Yersinia pestis</i>	Antigua	>30 x 10 ⁶
1346-1353	Peste negra	<i>Y. pestis</i>	Medievalis	>200 x 10 ⁶
1510-1511	Gripe	Virus de la gripe		nc
1557-1559	Gripe	Virus de la gripe		nc
1817-1824	Cólera: 1ª pandemia	<i>Vibrio cholerae</i>		>10 x 10 ⁶
1826-1837	Cólera: 2ª pandemia	<i>V. cholerae</i>		>10 x 10 ⁶
1846-1860	Cólera: 3ª pandemia	<i>V. cholerae</i>		>1 x 10 ⁶
1855-1960	Peste de Jünnan	<i>Y. pestis</i>	Orientalis	>12 x 10 ⁶
1863-1875	Cólera: 4ª pandemia	<i>V. cholerae</i>		>600 x 10 ⁶
1881-1896	Cólera: 5ª pandemia	<i>V. cholerae</i>		>298 x 10 ⁶
1899-1923	Cólera: 6ª pandemia	<i>V. cholerae</i>		>800 x 10 ⁶
1918-1920	Gripe “española”	Virus de la gripe	Influenza A H1N1	>100 x 10 ⁶
1957-1958	Gripe	Virus de la gripe	Influenza A H2N2	>1,1 x 10 ⁶
1961-continúa	Cólera: 7ª pandemia	<i>V. cholerae</i>	O138 biotipo Thor	nc
1969-1970	Gripe de Hong Kong	Virus de la gripe	Influenza A H3N2	>1,0 x 10 ⁶
1977-1978	Gripe rusa	Virus de la gripe	Influenza A H1N1	70 x 10 ⁶
1981-continúa	SIDA	VIH		>40 x 10 ⁶
2009-2010	Gripe	Virus de la gripe	Influenza A H1N1	nc
2019-2023	COVID-19	SARS-CoV-2		>7 x 10 ⁶



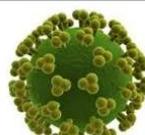
Yersinia pestis



Vibrio cholerae



Gripe



VIH



SARS-CoV-2

Figura 23. Principales pandemias ocurridas a lo largo de la historia (parte superior; nc, no conocido), mostrando las bacterias y virus responsables (parte inferior); (modificado de https://es.wikipedia.org/wiki/Anexo:Cronolog%C3%ADa_de_epidemias).

Basta recordar la reciente pandemia COVID-19, ocasionada por el virus emergente SARS-CoV-2 (*Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2*), de cuyas

consecuencias fuimos testigos, pero también la del SIDA debida al VIH (virus de la inmunodeficiencia humana) y las numerosas pandemias de peste, cólera y gripe, teniendo en cuenta que la mayoría ellas siguen aún vigentes.

No hay duda de que las enfermedades infecciosas causaron y siguen ocasionado hoy en día dolor, sufrimiento y temor, formando parte del “sentimiento trágico de la vida”, aunque el enfoque de la obra de Miguel de Unamuno (1864-1936) fuera otro. Como no podía ser menos, estas enfermedades han dejado una huella imborrable en la actividad artística, cuyo máximo exponente en pintura es quizás “El Grito” de Edvard Munch (1863-1944), maestro del expresionismo. La angustia manifestada en esta obra deriva en gran medida de las enfermedades que marcaron la vida del artista y fueron plasmadas en sus cuadros. Este es el caso de la tuberculosis, incurable por entonces, que provocó la muerte de su madre y su hermana Sophie o de la gripe española, que él mismo padeció. Centrándose también en la enfermedad, otros grandes pintores reflejaron “El triunfo de la muerte” que obliga a pensar en la peste (Brueghel “el Viejo”; 1526/1530-1569), “El garrotillo”, que se corresponde con la actual difteria (Francisco de Goya; 1746-1828) o la poliomielitis en “Triste herencia” (Joaquín Sorolla; 1863-1923), citando únicamente algunos ejemplos (Figura 24).



Figura 24. Las enfermedades infecciosas en la pintura. El grito (1893), La niña enferma (1907) y Autorretrato con la gripe española (1919) de Edvard Munch (parte superior, de izquierda a derecha). El triunfo de la Muerte (1562) de Pieter Brueghel “el Viejo”, El garrotillo (1893) de Francisco de Goya y Triste herencia (1899) de Joaquín Sorolla (parte inferior, de izquierda a derecha).

Las enfermedades infecciosas ocupan también un lugar central en la literatura universal. Basta recordar “La montaña mágica” de Thomas Mann (1875-1955), cuya acción transcurre en un sanatorio de los Alpes suizos dedicado a enfermos de tuberculosis, “La peste” de Albert Camus (1913-1960), “El amor en los tiempos del cólera” de Gabriel García Márquez (1927-2014) o el “Pabellón de reposo” de Camilo

José Cela (1916-2002), donde también se alojaban enfermos de tuberculosis (Figura 25). Los cuatro autores recibieron el Premio Nobel de Literatura en diferentes momentos (1929, 1957, 1982 y 1989, respectivamente).

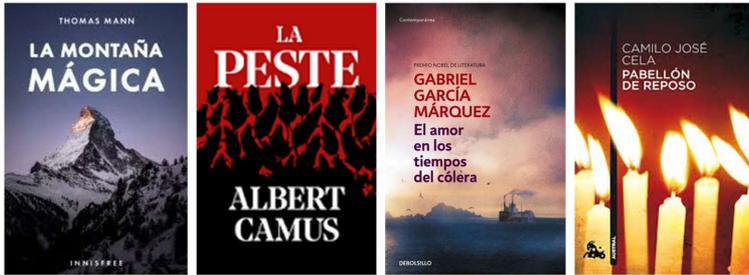


Figura 25. Las enfermedades infecciosas en la literatura.

Cabe destacar que el miedo a las enfermedades infecciosas se vio superado en gran medida durante la primera mitad del siglo XX, cuando la introducción del tratamiento con medicamentos antimicrobianos, junto con la implantación de medidas de higiene y la puesta en marcha de campañas de vacunación, hicieron pensar, de manera optimista, en su posible erradicación. En lo que se refiere al tratamiento, el descubrimiento del prontosil, cuyo principio activo es la sulfanilamida, por Gerhard Domagk (1895–1964; Premio Nobel de Medicina 1935) y de la penicilina por Alexander Fleming (1981-1955; Premio Nobel de Medicina 1945) (Figura 26), establecieron un antes y un después en el tratamiento de las enfermedades infecciosas [81, 82].

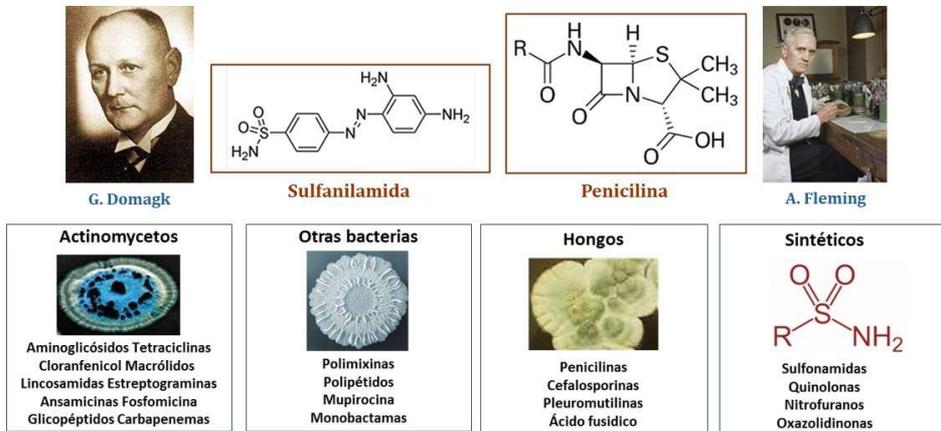


Figura 26. Estructura química de la sulfanilamida, principio activo del prontosil cuya acción antibacteriana fue demostrada por Gerhard Domagk, y estructura de la penicilina descubierta por Alexander Fleming (parte superior). Ejemplos de antibióticos producidos por microorganismos o conseguidos por síntesis química (parte inferior). En el caso de los microorganismos productores se muestran, de izquierda a derecha colonias de *Streptomyces coelicolor*, *Bacillus subtilis* y *Penicillium chrysogenum* (elaboración propia basada en [83]).

A partir de entonces se describieron muchos otros antibióticos producidos mayoritariamente por un grupo de bacterias que viven en el suelo, los actinomicetos, entre los que destaca el género *Streptomyces*. Un ejemplo relevante es la estreptomina, cuyo nombre deriva de esta bacteria, primer compuesto utilizado con éxito para el tratamiento de la tuberculosis, salvando millones de vidas. Cabe destacar que los actinomicetos producen más de dos tercios de los antibióticos de origen natural conocidos, siendo el resto sintetizado por otras bacterias y por hongos. Además, se obtuvieron nuevos agentes antimicrobianos por modificación química de compuestos naturales o por síntesis química total, dando lugar a un enorme arsenal de compuestos pertenecientes a numerosas familias (Figura 27). Particularmente importantes son las penicilinas, las cefalosporinas y las carbapenemas, antibióticos β -lactámicos de gran relevancia en medicina. La primera penicilina, descubierta por Fleming (penicilina G o benzilpenicilina), fue producida por el hongo *Penicillium notatum* y la primera cefalosporina (cefalosporina C) por el hongo *Acremonium chrysogenum* (previamente denominado *Cephalosporium acremonium*), mientras que los demás son derivados semisintéticos. Por su parte, el primer representante del grupo de las carbapenemas fue la tienamicina, producida por *S. catleya* [84].

El inmenso arsenal de antibióticos introducidos en la práctica médica a raíz de su descubrimiento permitió el control de numerosas enfermedades infecciosas, llevando a pensar que podrían quedar relegadas al pasado. Además, hizo factibles otros muchos procedimientos esenciales en la medicina actual, como son las operaciones quirúrgicas, los trasplantes y el tratamiento frente al cáncer. Se puede decir, por tanto, que la medicina moderna descansa en gran medida sobre ellos [84].

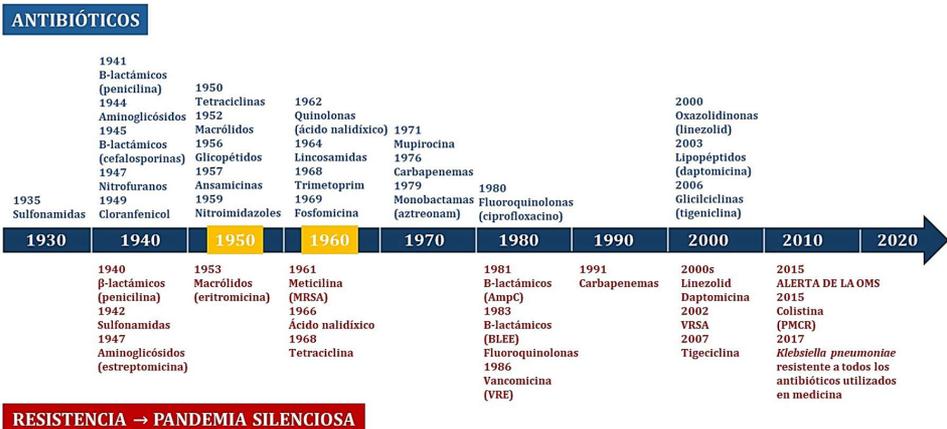


Figura 27. Principales antibióticos y contexto histórico de su descubrimiento (parte superior). Aparición de bacterias resistentes (parte inferior); (elaboración propia basada en [83]).

Desgraciadamente, el optimismo generado a raíz del descubrimiento de los antibióticos y su aplicación en medicina se vio frenado a partir de la década de 1970, al disminuir sustancialmente el número de nuevos compuestos que salieron al

mercado y, muy especialmente, por la continua aparición de bacterias resistentes (Figura 27). Estas bacterias, que escapan a la acción de los antibióticos, están provocando una grave crisis de salud pública a nivel mundial, dando lugar a la denominada pandemia silenciosa. Cabe destacar que la adquisición de resistencia a los antibióticos constituye un ejemplo impactante de evolución bacteriana a tiempo real, mediada por los procesos de mutación y transferencia genética horizontal comentados anteriormente (Figuras 16 y 17). Los cambios que se originan quedan sujetos a la selección positiva ejercida por la presencia del propio antibiótico [85].

Ante la gravedad del problema, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha puesto en marcha un Plan de Acción Global de lucha contra la resistencia [86]. Este plan tiene como objetivo general velar para que se mantenga la capacidad de tratar y prevenir las enfermedades infecciosas con medicamentos que sean eficaces y seguros, se utilicen de forma responsable y sean asequibles a todas las personas que los necesiten.

6.3.4. La microbiota humana

No es posible finalizar este apartado centrado en simbiosis sin referirnos a la microbiota humana. Durante mucho tiempo el estudio de las simbiosis recibió poca atención, debido probablemente a que constituyen una agresión contra el concepto de individuo [87]. Aunque la situación ha cambiado drásticamente en las últimas décadas, no hay mayor atentado contra la individualidad que el perpetrado por nuestra microbiota, teniendo en cuenta que el número de células microbianas existentes en el cuerpo humano es equivalente al de células propias [88] y el número de genes microbianos supera con creces al de genes humanos (Figura 28). Esto llevó a considerar al ser humano como un holobionte o “superorganismo”, donde sus componentes establecen una relación de interdependencia fundamentalmente mutualista [89].

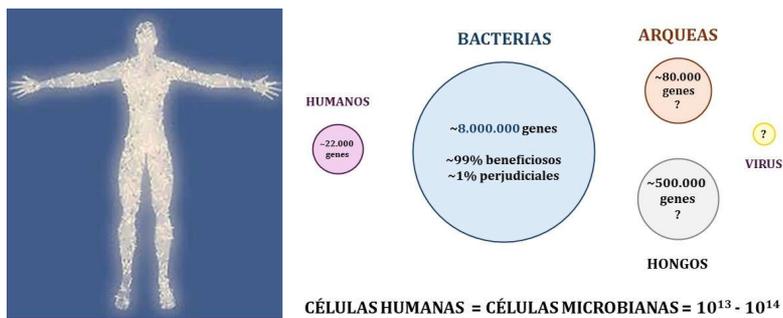


Figura 28. Composición del microbioma humano donde los círculos reflejan la abundancia relativa de cada grupo microbiano e indican el número de genes codificantes de proteínas (modificado de [90] y basado en información derivada del Proyecto Microbioma Humano: <https://hmpdacc.org/>).

El hospedador ofrece a la microbiota un ambiente adecuado para su crecimiento, reproducción y evolución. La microbiota por su parte desempeña numerosas

funciones beneficiosas para el hospedador, como son la defensa frente a agentes patógenos, el aporte de nutrientes esenciales (por ejemplo vitaminas) y la degradación de oligosacáridos y polisacáridos complejos de origen vegetal ayudando también al metabolismo de otros compuestos (como diferentes tipos de fármacos). Contribuyen además al desarrollo y correcto funcionamiento del tracto intestinal y del sistema nervioso, así como a la maduración del sistema inmunológico. Sin embargo, el desequilibrio de la microbiota, conocido como disbiosis, se ha asociado a un gran número de enfermedades, entre ellas la enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedades hepáticas, enfermedades autoinmunes, cáncer, obesidad y probablemente también enfermedades neurológicas [89].

6.4. Comunicación y comportamiento social: el lenguaje de las bacterias

“La comunicación es el puente entre la confusión y la claridad.”
Nat Turner (1800-1831)

Determinados procesos llevados a cabo por las bacterias solo se ponen en marcha cuando la densidad celular es elevada. Entre ellos destacan la bioluminiscencia, la formación de biopelículas, la virulencia y la interacción entre las bacterias y sus hospedadores. El éxito de estos procesos depende de la cooperación de un gran número de bacterias, esto es, de la existencia de cuórum. Para conocer si existe o no cuórum, las bacterias se comunican entre sí mediante la producción y liberación al exterior de determinadas moléculas denominadas autoinductores (Figura 29). Estas moléculas, una vez detectadas, actúan como señales químicas coordinando el comportamiento colectivo en respuesta a la densidad bacteriana. De este modo, las bacterias actúan como organismos multicelulares, contradiciendo la idea de que solo podrían hacerlo de manera individual [91].

El estudio de la bioluminiscencia, abordado independientemente por los científicos norteamericanos E. Peter Greenberg y Bonnie L. Bassler (Figura 29), fue decisivo a la hora de elucidar el lenguaje de las bacterias, o sea los mecanismos que utilizan para comunicarse entre sí. El grupo de Greenberg, adoptando como modelo la bacteria bioluminiscente *Vibrio fischeri* (actualmente renombrada como *Aliivibrio fischeri*) aportó información valiosísima sobre la actuación del autoinductor, que ya había sido descubierto con anterioridad, y de la proteína reguladora activada por él para poner en marcha la respuesta colectiva. Además, en un artículo seminal, publicado en el año 1994, acuñó el término *quorum sensing* (en español percepción de cuórum), para describir la autoinducción de la bioluminiscencia [92]. Posteriormente, la investigación de Greenberg se centró en *Pseudomonas aeruginosa*, bacteria patógena oportunista que causa infecciones tanto agudas como persistentes, asociadas estas últimas a la formación de biopelículas. Las biopelículas son estructuras organizadas, constituidas por numerosas bacterias que se encuentran englobadas en una matriz extracelular y adheridas a soportes muy

diversos. De esta forma las bacterias adquieren una elevada resistencia frente a factores ambientales adversos, destacando los antibióticos y los mecanismos defensivos del hospedador en el caso de las bacterias patógenas [93]. Además, el grupo de Greenberg demostró por primera vez la relación entre la percepción de cuórum y la formación de biopelículas. Sus estudios condujeron al descubrimiento de tres sistemas de percepción de cuórum en *P. aeruginosa* y la presencia de biopelículas de esta bacteria en el pulmón de pacientes con fibrosis quística, enfermedad hereditaria asociada al espesamiento de las secreciones mucosas [94]. Las biopelículas se pueden establecer no solo sobre secreciones espesas sino también sobre dispositivos médicos, como sondas, catéteres, válvulas cardíacas, prótesis de cadera, etc., causando infecciones que pueden poner en riesgo la vida del paciente y conllevar un elevado coste para los sistemas de salud [94].

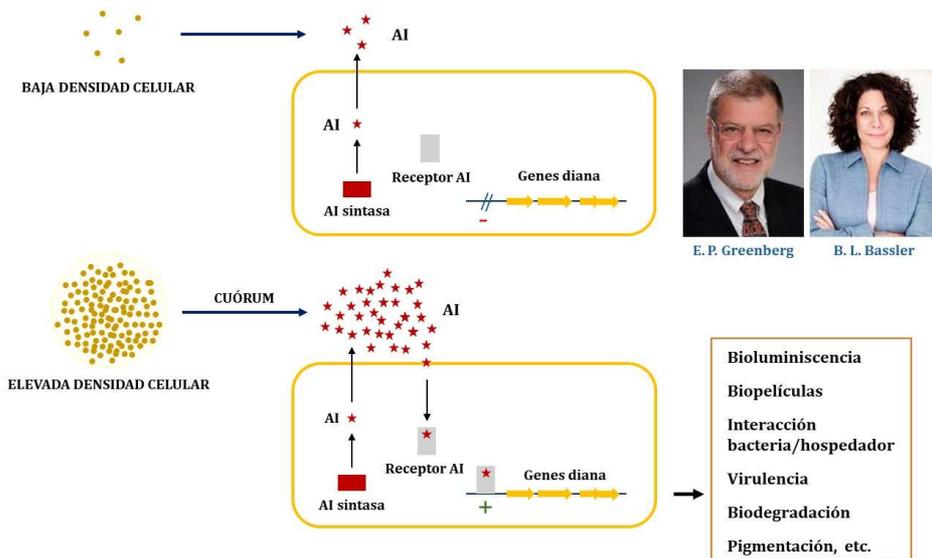


Figura 29. Percepción de cuórum y comunicación entre bacterias que ponen en marcha un gran número de procesos cuyo éxito depende de la densidad celular. AI, autoinductor (elaboración propia basada en [95]). Peter Greenberg y Bonnie Bassler (parte superior derecha) son investigadores clave en el estudio de estos procesos.

Por su parte, Bassler investigó la producción de luz por *Vibrio harveyi*, también bioluminiscente, descubriendo que las bacterias se pueden comunicar utilizando múltiples sistemas de percepción de cuórum [96]. Además, sus investigaciones establecieron la relación entre la percepción de cuórum por varios sistemas y la virulencia de *V. cholerae* [97], el agente causal del cólera que ocasionó en el pasado y sigue causando hoy en día importantes pandemias [98] (Figura 23). De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, “desde mediados de 2021, el mundo se enfrenta a un agudo repunte de la séptima pandemia de cólera, caracterizado por el número, la magnitud y la concurrencia de múltiples brotes, la propagación a zonas que llevaban decenios libres de esta enfermedad y unas tasas de mortalidad

alarmantemente altas.” No obstante, quizá el descubrimiento más sorprendente realizado por Bassler fue la demostración de que la comunicación basada en la percepción de cuórum no solo ocurre entre bacterias pertenecientes a la misma especie, sino también entre bacterias de especies diferentes [99]. Así, cada bacteria utiliza un idioma propio que solo entienden los miembros de su misma especie, pero existe además un lenguaje universal que permite la comunicación entre especies, coordinando el comportamiento colectivo a nivel de comunidad. Sería "el esperanto de las lenguas bacterianas", según palabras de la propia Bassler.

Gracias a sus estudios sobre percepción de cuórum, Greenberg y Bassler recibieron el Premio Princesa de Asturias de Investigación Científica y Técnica 2023. El premio fue compartido con Jeffrey I. Gordon, uno de los investigadores más relevantes en el campo de la microbiota humana. El jurado valoró la contribución de estos tres investigadores sobre el “papel imprescindible de las comunidades de microorganismos en la vida sobre la Tierra, incluyendo la de los seres humanos”.

7. ¿Y qué hay de los virus?: ¿cuándo, cómo y por qué surgieron?

“Un virus es un trozo de ácido nucleico rodeado de malas noticias.”

Peter Medawar (1915-1987)

El término “virus” deriva del latín y significa veneno. Para comprender su nombre, basta recordar la reciente pandemia COVID-19, sin olvidar las del SIDA y la gripe, como claro ejemplo de la amenaza que representan para la salud humana aún en nuestros días (Figura 23). Sin embargo, los virus son mucho más que agentes dañinos. Se trata de las entidades biológicas más abundantes en la Tierra [100], donde desempeñan un papel esencial en la ecología y en la evolución de los organismos celulares. Los virus contribuyen a controlar el número de individuos en poblaciones y comunidades, manteniendo el equilibrio y actuando como agentes de cambio.

De forma simplificada, los virus se han definido como parásitos intracelulares obligados de muy pequeño tamaño [101]. De manera más amplia, se consideran entidades biológicas sencillas, que secuestran la maquinaria biosintética de una célula hospedadora para replicar su genoma y sintetizar la cubierta que lo protege, denominada cápsida [102]. El genoma viral junto con la cápsida constituye la partícula viral o virión, que es la forma infectiva de los virus, responsable de su propagación. Cabe destacar que los virus son las únicas entidades replicativas que poseen como material genético cualquiera de los cuatro tipos de ácido nucleico: RNA o DNA en cadena sencilla o doble, existiendo múltiples estrategias para su replicación. Los que infectan a bacterias, denominados bacteriovirus, bacteriófagos o fagos, pueden interactuar con la célula hospedadora mediante el ciclo lítico o a través del ciclo lisogénico. El primero conduce a la formación de nuevas partículas

virales y típicamente culmina con la destrucción de la bacteria infectada. Por el contrario, durante el ciclo lisogénico el virus integra su genoma en el cromosoma de la bacteria, replicándose como parte de este sin causar daño. Los bacteriófagos que pueden utilizar el ciclo lisogénico se denominan temperados.

Las dos definiciones de virus mencionadas anteriormente establecen el parasitismo intracelular obligado como señal de identidad de los virus, hecho que excluiría su existencia en un mundo protocelular [35]. Teniendo esto en cuenta, la hipótesis más atractiva sobre el origen de los virus, aunque no la única, propone su evolución a partir de células antiguas mediante un proceso de reducción. En concreto, habrían surgido de células ya extinguidas que, procedentes de FUCA, existieron antes de la diversificación de LUCA (Figura 30). La existencia en virus actuales que infectan a bacterias, arqueas y eucariotas de genes específicos que no tienen homólogos detectables en genomas celulares, apoya esta idea. La abundancia de dichos genes, junto con su presencia en distintos grupos de virus, sugiere su aparición en momentos tempranos del proceso evolutivo. Este escenario encaja también con la Biología Evolutiva de los endosimbiontes parasíticos celulares, cuya evolución por reducción del genoma ha sido confirmada [103]. Obviamente, no se descarta la aparición de nuevos virus en épocas posteriores, en respuesta a la evolución de nuevos hospedadores. De hecho, a diferencia de los organismos celulares, desde los trabajos pioneros de Baltimore [104, 105], se sabe que los virus no constituyen un grupo monofilético, esto es, no todos comparten el mismo origen. De acuerdo con ello, diferentes grupos de virus pudieron surgir mediante distintas rutas evolutivas, que no tendrían que haber ocurrido al mismo tiempo.

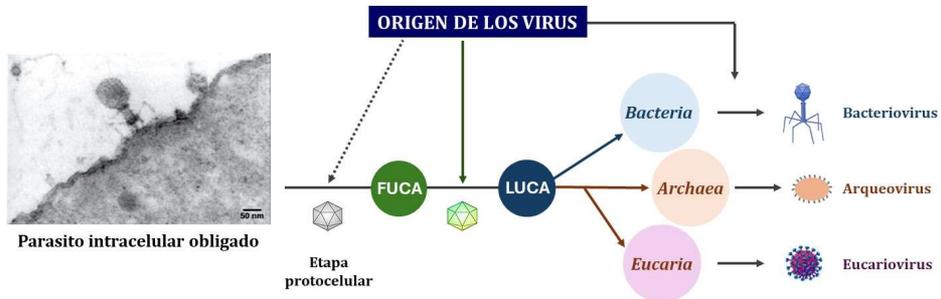


Figura 30. Virus bacteriano infectando a una célula, de acuerdo con su parasitismo intracelular obligado (izquierda). Diversas posibilidades sobre el origen de los virus (derecha); (elaboración propia basada en [35]).

De cualquier manera, el mecanismo mediante el cual las células primitivas evolucionaron a virus no está claro. Se piensa que el genoma de las células primitivas, posteriores al mundo RNA y anteriores a LUCA, habría sido RNA segmentado [35]. Por ello, una posibilidad atractiva, aunque no es la única, sería la evolución de virus RNA a partir de células RNA. En virus RNA habría surgido la utilización del DNA como mecanismo de escape frente a las defensas de las células RNA. Posteriormente, el DNA habría sido adoptado por las células RNA

evolucionando a células DNA [35]. De ser así, los virus habrían inventado el DNA, lenguaje utilizado por todas las células actuales como depositario de la información genética, al igual que las bacterias inventaron la comunicación social (apartado 6.4).

Si ya resulta difícil establecer cuándo y cómo surgieron los virus, aún lo es más entender el porqué de su aparición. Dado que los virus poseen una fase extracelular, pudieron haber sido seleccionados como un mecanismo adoptado por las células para incrementar su diversidad, y en consecuencia su eficacia biológica, al permitir el intercambio de genes mediante el proceso de transducción (apartado 6.2). Como se comentó anteriormente, esta función es particularmente relevante en células procariotas donde la transferencia genética horizontal constituye, junto con la mutación, el motor esencial para su rápida evolución y adaptación. Por otro lado, aunque muchos virus actuales matan a la célula hospedadora, los virus latentes no lo hacen, siendo posible que la capacidad lítica apareciera más tarde como forma eficaz de acceder a nuevos hospedadores. En tiempos presentes, los virus continúan desempeñando un importante papel en la evolución de los organismos celulares, además de ejercer una enorme presión sobre la salud humana y la economía global.

8. La batalla entre procariotas y virus

“Las Ciencias aplicadas no existen, solo las aplicaciones de la Ciencia.”

Louis Pasteur (1822-1895)

Desde el descubrimiento de los microorganismos por Anton van Leeuwenhoek (1632-1723) a mediados del siglo XVII, la Microbiología ha realizado enormes avances en la comprensión de procariotas, virus y microorganismos eucariotas. Esta disciplina ha contribuido de manera decisiva al conocimiento científico en general, revelando, por ejemplo, que el DNA, no las proteínas, es el portador de la información genética; ayudando a esclarecer procesos biológicos esenciales como la replicación del material genético, la transcripción, la traducción y la regulación de la expresión génica; permitiendo elucidar muchas de las rutas metabólicas, tanto anabólicas como catabólicas, que operan a nivel celular; y contribuyendo a dilucidar los mecanismos de generación de energía derivada de las últimas y necesaria para las primeras. Por otro lado, la aplicación de los conocimientos adquiridos ha reportado indudables beneficios para la salud y el bienestar humanos, permitiendo la prevención y curación de las enfermedades infecciosas, la producción a escala industrial de una gran variedad de compuestos útiles, la obtención de biocombustibles como alternativa a los de origen fósil, la descontaminación del medio ambiente, junto con importantes mejoras en agricultura, ganadería y alimentación.

A continuación, en defensa de la investigación básica, no solo como fuente de conocimiento sino también por sus impredecibles y sorprendentes repercusiones a nivel aplicado, utilizaré dos ejemplos derivados del estudio de las interacciones entre procariotas y virus. De manera inesperada, dos de las mayores revoluciones

científicas de todos los tiempos, en concreto el nacimiento de la Ingeniería Genética durante la década de 1970 del siglo XX y el descubrimiento a principios del siglo XXI de los sistemas CRISPR-Cas, que dio lugar a la edición genética de alta precisión, descansan sobre los mecanismos de defensa de los procariontes frente a los virus.

8.1. Las endonucleasas de restricción y el nacimiento de la Ingeniería Genética

La Ingeniería Genética consiste en la manipulación intencionada, y por tanto artificial, de la información genética. Se asienta en la Clonación Molecular, esto es en el aislamiento y propagación de cualquier segmento de DNA, generalmente uno o más genes, procedente de cualquier organismo, para su posterior estudio y/o utilización de sus productos.

En cuanto a su desarrollo histórico (Figura 31), la Ingeniería Genética surgió a raíz del descubrimiento de las endonucleasas de restricción que emplean bacterias y arqueas para protegerse frente a la infección por virus. La historia de estas enzimas se remonta a principios de la década de 1950, cuando dos grupos de investigación observaron, de manera independiente, que algunas bacterias producían un “factor de restricción” que impedía el desarrollo intracelular de sus virus [106, 107]. Sin embargo, la naturaleza de dicho factor no se descubrió hasta 1968, cuando el grupo de investigación de Werner Arber (1929-) consiguió aislar un enzima, identificado como el factor de restricción, que cortaba selectivamente DNA exógeno de doble cadena, reconociendo una secuencia específica [108]. Los estudios del grupo de Arber revelaron también la existencia de los enzimas de modificación, que protegen al DNA bacteriano de la degradación por las endonucleasas de restricción a las que acompañan. La modificación ocurre mediante metilación de bases nitrogenadas (adeninas o citosinas) pertenecientes a nucleótidos localizados dentro de la secuencia de reconocimiento. Estas dos actividades enzimáticas constituyen los denominados sistemas de restricción-modificación, de los que existen cuatro tipos (tipo I a tipo IV; [109]). En los de tipo I, que fueron los descubiertos por Arber, las actividades de reconocimiento, modificación y restricción residen en complejos multiproteicos. La modificación ocurre dentro de la secuencia de reconocimiento mientras que el corte tiene lugar al azar, a cierta distancia de ella.

Poco después de la publicación de los resultados de Arber, el grupo de Hamilton Smith confirmó y amplió sus estudios, al detectar y purificar un enzima de restricción producido por *Haemophilus influenzae* que reconocía una secuencia específica de seis pares de bases (pb) en DNA bicatenario y cortaba dentro de ella. Se trata de la primera endonucleasa perteneciente a un sistema de restricción-modificación de tipo II [110]. A diferencia de los anteriores, en estos últimos la actividad endonucleasa y metiltransferasa residen en proteínas independientes y ambas actúan, de manera específica, dentro de la secuencia de reconocimiento. El inmenso potencial de los enzimas de restricción de tipo II se puso de manifiesto

inicialmente gracias a su utilización para mapear el genoma del virus oncogénico SV40 (*Simian Virus 40*) por el grupo de Daniel Nathans [111], demostrando así su aplicación al análisis genético, y posteriormente cuando se generalizó su uso como herramientas esenciales para la clonación de genes. Por sus investigaciones, Arber, Smith y Nathans compartieron el Premio Nobel de Medicina de 1978 (Figura 31).

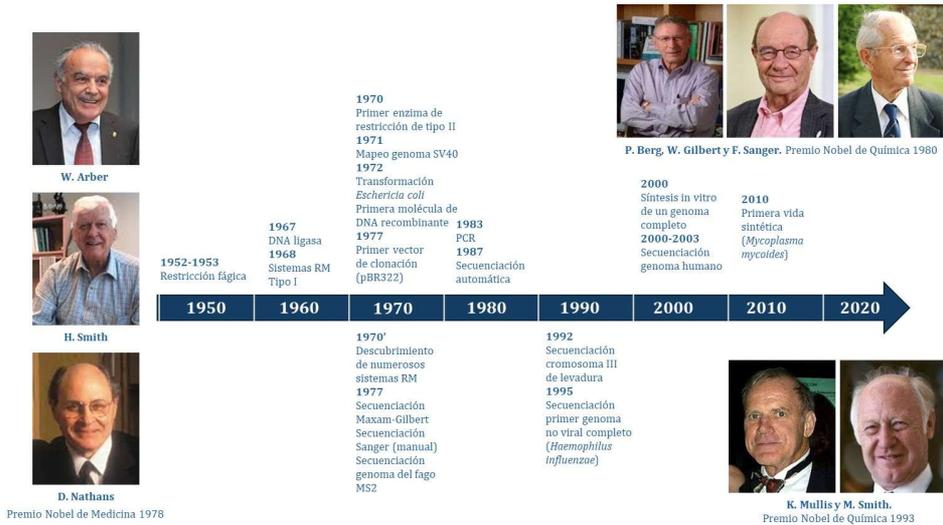


Figura 31. Hitos históricos en Ingeniería Genética, reconocidos por la concesión de Premios Nobel a relevantes investigadores (elaboración propia basada en <https://www.neb.com/en/tools-and-resources/feature-articles/foundations-of-molecular-cloning-past-present-and-future?srsltid=AfmBOoqH32o03uFxUHjxsF7zBzsa2NZG9JJlE1EqkC45MiTWqTOc9-Vdr>).

A lo largo de los años se han descubierto más de 4000 enzimas de restricción con unas 350 secuencias específicas de reconocimiento. En los sistemas de restricción-modificación de tipo II el tamaño de estas últimas varía entre cuatro y ocho pb. En cuanto a nomenclatura, los enzimas de restricción se designan con la primera letra del género donde se detectaron, escrita en mayúscula, seguida de las dos primeras letras de la especie, en minúscula, y de una o más letras adicionales que hacen referencia a la cepa concreta de la especie productora [112]. Delante del nombre se añade R. o M. cuando es necesario distinguir el enzima de restricción del de modificación. Un ejemplo es EcoRI (R.EcoRI), primer enzima de restricción detectado en la cepa R de *Escherichia coli*, acompañado del enzima de modificación M.EcoRI. Información sobre los componentes de los sistemas de restricción-modificación conocidos, relativa a secuencia de reconocimiento, sitios de corte y metilación, datos de secuenciación y de cristalografía, y disponibilidad comercial están recopilados en la base de datos REBASE (rebase.neb.com).

Utilizando enzimas de restricción de tipo II cualquier gen o segmento de DNA de interés puede ser clonado, esto es aislado, para su posterior propagación, estudio y manipulación (Figura 32). Actuando como tijeras moleculares, estos enzimas generan, a partir del DNA donador, una colección de fragmentos que son a

continuación insertados en un vector de clonación creando moléculas de DNA recombinante. Por ello, la Clonación Molecular se denomina también Tecnología del DNA Recombinante. Como vectores de clonación se pueden utilizar moléculas de DNA plasmídico o viral que contienen un sitio de reconocimiento específico para la endonucleasa que generó la colección de fragmentos y uno o más marcadores, normalmente genes de resistencia a antibióticos o genes cuyos productos son fácilmente detectables (como el gen que codifica el enzima β -galactosidasa). Estos marcadores permiten la selección de células portadoras del vector original y también de las que lleven moléculas recombinantes que constan de DNA exógeno unido al vector. El descubrimiento de enzimas capaces de unir piezas de DNA bicatenario de diferente origen fue otro hito clave para la Ingeniería Genética. Estos enzimas se denominan ligasas, siendo la T4 DNA ligasa, procedente del bacteriófago T4, la más utilizada en clonación [113].

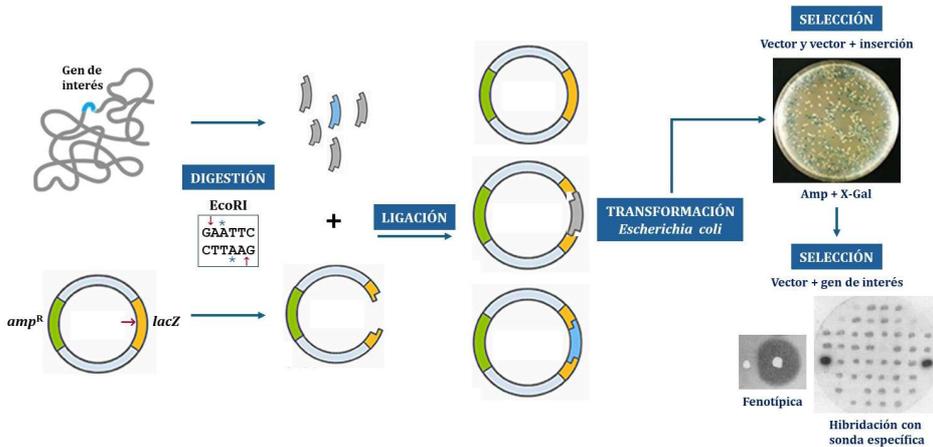


Figura 32. Esquema de un experimento de clonación y mecanismo de actuación del sistema de restricción modificación EcoRI utilizado en dicho experimento. La endonucleasa corta dentro de la secuencia de reconocimiento en los sitios indicados por las flechas, originando extremos cohesivos. Por su parte, el enzima de modificación acompañante metila las adeninas señaladas con asteriscos, impidiendo la actuación del enzima de restricción sobre el DNA propio, pero no sobre DNA exógeno. En la primera etapa de selección, la presencia de un sustrato artificial del enzima β -galactosidasa (X-Gal), permite diferenciar las colonias portadoras de la molécula recombinante (color blanco) de las que llevan el vector original (color azul). En la segunda etapa de selección se confirma la identidad del DNA clonado (elaboración propia basada en <https://www.thermofisher.com/es/es/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/molecular-cloning/cloning/traditional-cloning-basics.html>).

Una vez generado in vitro, el resultado de la ligación se introduce en un hospedador adecuado para su propagación. Esto se consigue mediante los procesos de transformación (en el caso de vectores plasmídicos) o transfección (en el caso de vectores virales). Inicialmente se pensó que *E. coli*, hospedador más frecuentemente utilizado en experimentos de clonación, era refractario a dichos procesos. La situación cambió cuando se demostró que el tratamiento con CaCl_2 en frío hacía a *E.*

coli competente para la incorporación de DNA exógeno (fágico en el experimento inicial; [114]). Este procedimiento fue utilizado después para introducir por primera vez en *E. coli* un plásmido de resistencia [115]. Otras bacterias, cuya competencia no se consigue inducir mediante tratamiento químico de células intactas, pueden incorporar DNA previa transformación en protoplastos. Los protoplastos son estructuras bacterianas desprovistas de pared celular, osmóticamente sensibles y esféricas, independientemente de la forma de la bacteria a partir de la cual se hayan originado [116]. Su tratamiento con polietilenglicol permite la entrada en su interior de DNA exógeno y, bajo condiciones experimentales apropiadas, pueden después revertir a células vegetativas y reproducirse, perpetuando la nueva información genética adquirida [117].

La etapa final de un experimento de clonación será la selección de las células hospedadoras que contengan el vector con el fragmento de DNA que interesaba aislar. La selección se realiza inicialmente en base al marcador del vector (gen que confiere resistencia al antibiótico ampicilina) y se facilita cuando la inserción del DNA exógeno interrumpe un segundo gen marcador, por ejemplo, el que codifica el enzima β -galactosidasa, localizado en el vector. Existen varios métodos para confirmar que el DNA clonado se corresponde realmente con el gen de interés, por ejemplo, en base a su función (selección fenotípica) o mediante hibridación con una sonda de DNA específico.

Continuando con la historia, poco después del descubrimiento de los enzimas de restricción de tipo II y del enzima DNA ligasa, el grupo de Paul Berg consiguió crear las primeras moléculas de DNA recombinante, resultantes de la inserción de un fragmento de DNA del bacteriófago λ y de un fragmento del operón galactosa de *E. coli* en DNA del virus SV40 [118]. Estos experimentos demostraron que, gracias a la universalidad del DNA, es posible unir fragmentos de esta molécula de diferente procedencia. Sin embargo, fue la comprobación, de manera consecutiva, de que genes de *E. coli*, genes de otras bacterias e incluso genes de células animales podían ser clonados, propagados y expresados en bacterias, dando lugar a proteínas funcionales, lo que abrió el camino de la Clonación Molecular, inaugurando la era de la Ingeniería Genética [119, 120]. A partir de entonces, la Tecnología del DNA Recombinante experimentó un crecimiento exponencial, tanto en sofisticación metodológica como en aplicaciones. Con el tiempo se fueron desarrollando herramientas cada vez más poderosas para la clonación y manipulación del DNA, incluyendo métodos más eficaces de introducción del DNA recombinante en células receptoras; vectores más versátiles y con mayores prestaciones, permitiendo por ejemplo, la sobreexpresión de genes gracias a la incorporación de promotores fuertes o la regulación de la expresión génica; mejores estrategias para la detección de genes clonados; o métodos para la obtención de segmentos de DNA complementarios al RNAm obtenidos por acción de la transcriptasa reversa, haciendo posible su posterior clonación. Esto último resulta crucial para el estudio y manipulación de genes eucariotas, caracterizados por la presencia de intrones.

Por otro lado, la introducción en la experimentación científica de las primeras técnicas de secuenciación del DNA desarrolladas por Allan Maxam y Walter Gilbert [121] y por Frederick Sanger y colaboradores [122], así como de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR; *Polymersase Chain Reaction*) y de sus múltiples variantes [123, 124], tuvieron un enorme impacto en Ingeniería Genética, al igual que en otras muchas ramas del saber. Además, la PCR junto con el método de secuenciación de Sanger, conocido como de primera generación, fueron decisivos para el desarrollo de diferentes técnicas de secuenciación de nueva generación, que dieron lugar al auge de la Genómica.

La importancia de lo expuesto anteriormente se refleja en la concesión a Paul Berg, en cuyo laboratorio se realizaron los primeros experimentos de ligación de fragmentos de DNA de distinto origen, Walter Gilbert y Frederick Sanger del Premio Nobel de Química de 1980 “por sus estudios fundamentales en la bioquímica de ácidos nucleicos, en particular del DNA recombinante” (Figura 31). Por su parte, Kary Mullis compartió con Michael Smith el Premio Nobel de Química de 1993, por la invención de la PCR y por el desarrollo del método de mutagénesis dirigida, respectivamente (Figura 31). El impacto de la PCR fue y sigue siendo hoy en día de tal magnitud que *The New York Times* la describió como técnica “altamente original y significativa, que dividió la Biología en un antes y un después”. Cabe destacar que la Taq polimerasa utilizada en la PCR, producida por la bacteria termófila *Thermus aquaticus*, las endonucleasas de restricción de tipo II, la T4 DNA ligasa y la transcriptasa reversa son solo algunos de los enzimas derivados de procariontes y virus que han jugado un papel esencial en la gran revolución científica que se inició en el último tercio del siglo XX con el nacimiento de la Tecnología del DNA Recombinante. De hecho, desde su introducción, esta tecnología ha realizado aportaciones esenciales en el campo de la Biología Molecular, proporcionando información sobre el funcionamiento de genes, virus, células y organismos. A nivel aplicado se consiguieron sintetizar proteínas eucariotas funcionales a partir de sus genes clonados en *E. coli*, permitiendo su producción a escala industrial. Entre las primeras proteínas humanas conseguidas se encuentran la hormona del crecimiento, que hasta entonces solo se podía obtener a partir de la pituitaria de los muertos, la insulina y el interferón α . También se logró la producción en distintos hospedadores de antígenos inmunológicamente reactivos para su utilización como vacunas, por ejemplo frente a la hepatitis B, o la expresión de rutas de síntesis de antibióticos y otros compuestos bioactivos. Además, la Tecnología del DNA Recombinante condujo al desarrollo de organismos genéticamente modificados, como plantas de interés agroalimentario resistentes a enfermedades o herbicidas. En conjunto, estos y otros muchos logros sentaron las bases para la creación de numerosas compañías biofarmacéuticas y biotecnológicas, muchas de ellas dedicadas a la comercialización de productos requeridos en Ingeniería Genética.

8.2. CRISPR-Cas: el sistema inmune de los procariotas y el nacimiento de la nueva edición genómica

Las bacterias y las arqueas no solo disponen de sistemas de restricción-modificación como mecanismo de defensa frente a la invasión de DNA exógeno. Poseen también un programa defensivo basado en el RNA, encargado de la destrucción de DNA viral o de cualquier otro origen (por ejemplo, plásmidos y otros elementos genéticos transferidos horizontalmente). Se trata del sistema CRISPR-Cas, cuyas siglas proceden de las iniciales en inglés de “Repeticiones Palindrómicas Cortas Agrupadas y Regularmente Interespaciadas” (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) y proteínas asociadas (*CRISPR-associated* o Cas). CRISPR-Cas actúa a modo de sistema inmune primitivo, compartiendo las dos características esenciales del sistema inmune adaptativo de organismos superiores, la especificidad y la memoria [125].

Las regiones CRISPR del genoma de procariotas son esencialmente un banco de memoria constituido por cortas secuencias de nucleótidos, de 24 a 47, procedentes de DNA foráneo que había invadido previamente a una arquea o a una bacteria. Estos segmentos, denominados espaciadores, alternan con una misma secuencia palindrómica repetida, de menos de 50 nucleótidos, y son utilizados para detectar y abortar una nueva invasión. De hecho, confieren resistencia frente a DNA exógeno, y a veces también RNA [126], que presente homología con cualquier espaciador. Los loci CRISPR incluyen, además, genes que codifican proteínas Cas que desempeñan funciones esenciales durante la actuación del sistema. Aunque existen diferencias entre distintos sistemas, en general dicha actuación transcurre en tres etapas: adaptación, maduración o biogénesis del crRNA e interferencia o silenciamiento (Figura 33).

La etapa de adaptación consiste en la captura y almacenamiento de los espaciadores con intervención de Cas1 y Cas2. A continuación, durante la etapa de maduración la región CRISPR se transcribe de manera conjunta dando lugar a una única molécula de RNA de gran longitud, conocida como pre-crRNA (pre-CRISPR RNA). Esta molécula es cortada en el interior de las secuencias repetidas que separan los espaciadores, gracias a la acción endorribonucleasa de proteínas Cas. Así se originan pequeños fragmentos de RNA, denominados crRNA (CRISPR RNAs), que contienen un espaciador flanqueado por RNA procedente de las secuencias repetidas. Finalmente, la etapa de interferencia ocurre cuando uno de estos crRNA, incorporado en un complejo ribonucleoproteico, aparea con un ácido nucleico invasor que será destruido por la actividad nucleasa de proteínas Cas [127-129]. En algunos casos, la captura de espaciadores requiere la proximidad de un motivo denominado PAM (*Protospacer Adjacent Motif*), de 2 a 4 nucleótidos, que también es esencial para la unión del complejo ribonucleoproteico al DNA diana durante la etapa de interferencia, para evitar el corte del espaciador en los loci CRISPR

cromosómicos y para la correcta discriminación entre lo propio y lo ajeno [130-132].

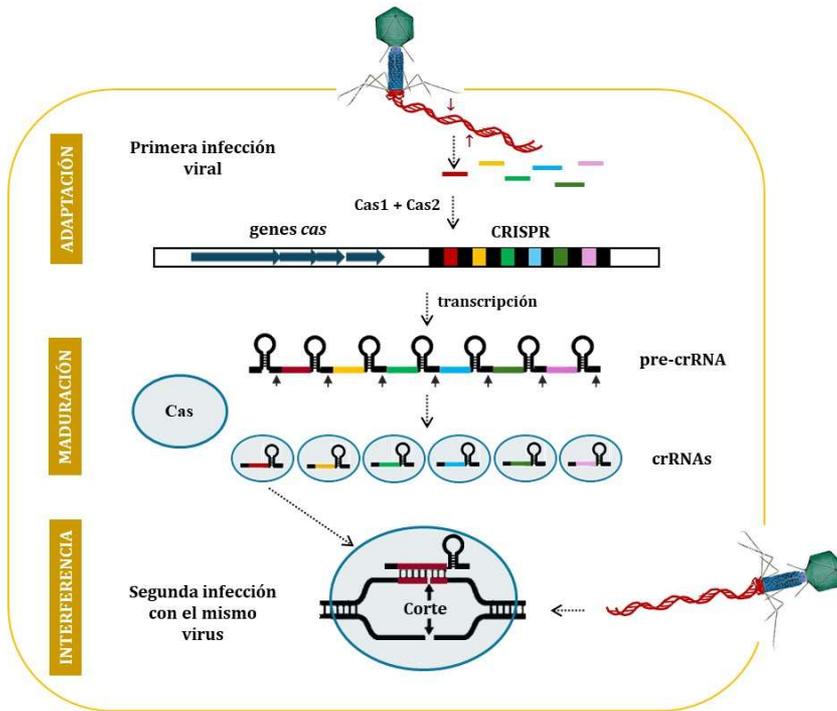


Figura 33. Etapas de actuación del sistema CRISPR-Cas (elaboración propia basada en la edición alemana de Campbell Biology [133]).

En cuanto al desarrollo histórico (Figura 34), el primer locus CRISPR fue descubierto en 1987, durante el estudio del gen *iap* cuyo producto es responsable del cambio de isoenzima de la fosfatasa alcalina en la cepa K12 de *E. coli*. A continuación de este gen se localizaron repeticiones de 29 nucleótidos separadas por una serie de secuencias espaciadoras, también de pequeño tamaño, pero diferentes entre sí [134, 135].

El término CRISPR fue acuñado por Jensen y colaboradores [136], quienes documentaron, además, la existencia de un número de genes codificadores de proteínas, adyacentes a los loci CRISPR. Había nacido el paradigma CRISPR-Cas. El siguiente hito en la historia de este sistema consistió en la detección de 4500 loci CRISPR en genomas secuenciados procedentes de 67 cepas tanto de bacterias como de arqueas [137]. Su comparación con bases de datos reveló que las secuencias espaciadoras coincidían con fragmentos de DNA fágico o plasmídico, lo cual indicaba la función defensiva de los sistemas CRISPR-Cas frente a DNA invasor [138]. Fue entonces cuando se propuso su actuación como sistema inmune adaptativo de bacterias y arqueas. Ese mismo año, otros autores correlacionaron también las secuencias espaciadoras con DNA foráneo [130, 139]. Sin embargo, la primera

demonstración experimental de la interferencia por CRISPR-Cas no llegó hasta dos años más tarde, en un estudio fundamental que también documentó la adquisición de nuevos espaciadores en respuesta a una infección fágica y demostró el papel esencial de las proteínas Cas en la defensa [127]. Poco tiempo después se puso de manifiesto que la actividad de corte programada por RNA llevada a cabo por CRISPR-Cas podía ser utilizada para alterar cualquier secuencia de DNA de cualquier célula con una facilidad sin precedentes [140, 141]. Se demostró así su inmenso potencial como herramienta de edición genómica de alta precisión, en otro clarísimo ejemplo de cómo la investigación básica constituye el pilar sobre el que se asienta la “ciencia aplicada”.



Figura 34. Hitos históricos que condujeron al descubrimiento del sistema CRISPR-Cas y su desarrollo como herramienta de edición genética de alta precisión, mostrando los principales investigadores responsables de esto último [142]).

Coincidiendo con otros mecanismos defensivos, los sistemas CRISPR-Cas han evolucionado en el marco de la incesante carrera armamentística entre procariontas y virus, lo que resulta en una diversidad extrema en cuanto a proteínas Cas y arquitectura de los loci [143]. En base a ello, los sistemas CRISPR-Cas se distribuyen en dos clases, clase I y clase II, divididas a su vez en varios tipos y estos en variantes [144, 145]. Cas1 y Cas2 son comunes a la mayoría, mientras que muchas otras proteínas difieren dependiendo de la clase y tipo de sistema. Las herramientas más ampliamente utilizadas en edición genómica se basan en CRISPR-Cas9, perteneciente a un sistema de clase II, procedente de *Streptococcus pyogenes* [140, 141].

Al igual que las endonucleasas de restricción, Cas9 actúa como tijera molecular cortando específicamente DNA de doble cadena. La especificidad está determinada por el crRNA que contiene RNA homólogo a la secuencia diana que se quiere editar y que funciona como guía molecular. La actuación de Cas9 requiere también un RNA

adicional, el crRNA transactivador (tracrRNA), codificado por el locus CRISPR-cas, que se aparea con el crRNA. Ambos RNAs fueron combinados en una única molécula de RNA guía (sgRNA) el cual actúa a modo de misil dirigido, guiando a Cas9 hacia una ubicación específica donde genera los cortes en las dos hebras del DNA bicatenario (DSB). Tanto el sgRNA como Cas9 se expresan a partir de sus secuencias clonadas en un vector.

Dependiendo de la disponibilidad o no de DNA homólogo adicional, los cortes en doble cadena generados por Cas9 podrán ser reparados por mecanismos diferentes (Figura 35). En ausencia de DNA homólogo, los cortes activan el “sistema de unión de extremos no homólogos” (NHEJ), el cual genera mutaciones al provocar inserciones o deleciones de unas pocas pb, acompañadas o no de cambios en la pauta de lectura. De esta manera se consigue la inactivación de genes. En cambio, si se aporta el DNA de interés flanqueado por secuencias que presenten homología, los cortes ocasionados ponen en marcha el “sistema de reparación dirigido por homología” (HDR) que permite por ejemplo reemplazar un gen alterado por uno normal o generar fusiones bien con genes reporteros o bien con secuencias reguladoras, activadoras o represoras [146, 147]. Además, Cas9 ha sido alterada introduciendo mutaciones que afectan a los aminoácidos implicados en la generación de DSBs, dando lugar a variantes que realizan cortes en una sola cadena (*nicks*) o catalíticamente inactivas pero que aún mantienen la capacidad de unión a la secuencia específica. Por otro lado, la fusión de variantes de Cas9 con otras proteínas o con dominios reguladores ha permitido, por ejemplo, la activación de la expresión génica (Figura 35), la edición de nucleótidos individuales o la modificación de la cromatina.

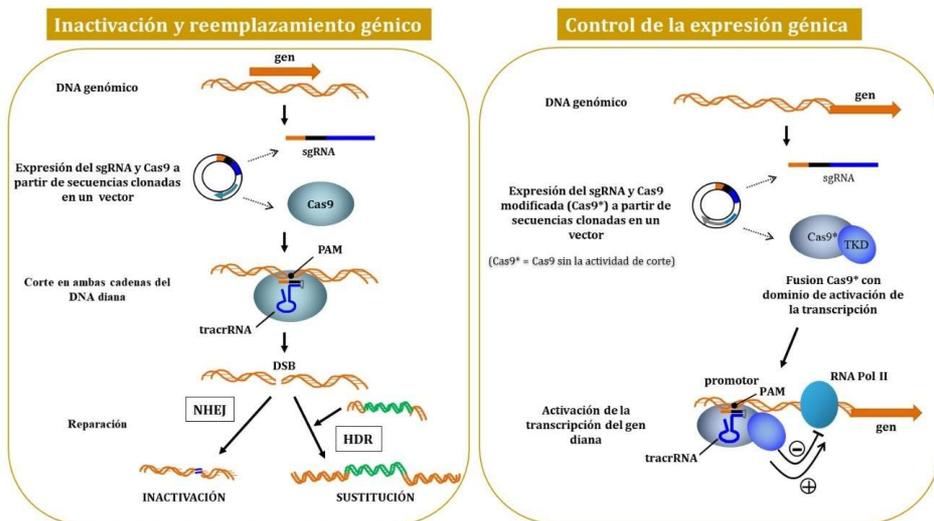


Figura 35. Principales aplicaciones del sistema CRISPR-Cas9 (DSB, corte en las dos hebras del DNA; NHEJ, reparación mediante unión de extremos no homólogos; HDR, reparación dirigida por homología); modificado de la edición alemana de Campbell Biology [133].

Junto con Cas9 otras proteínas Cas, que actúan por ejemplo a nivel de RNA, se han incorporado a las herramientas de edición genómica, ampliando la versatilidad de CRISPR-Cas [148]. Gracias a ello, la pasada década ha sido testigo del desarrollo de diferentes plataformas de edición genómica, que ofrecen oportunidades únicas para elucidar procesos biológicos complejos permitiendo avances sin precedentes en numerosas ramas de la ciencia, como medicina, agricultura, ganadería y biotecnología. En cuanto a su aplicación en medicina, la edición genómica por CRISPR-Cas9 en terapia humana fue aprobada por primera vez a finales de 2023 en el Reino Unido, en concreto para el tratamiento de enfermedades de la sangre, como la anemia de Sickle y la β -talasemia [149]. Se abre así una nueva era en el tratamiento de las enfermedades humanas de origen genético, cuyo impacto será sin duda equivalente al derivado de la introducción de los antibióticos en el control de las enfermedades infecciosas. Si los antibióticos se consideran el mayor logro de la medicina del siglo XX, la tecnología CRISPR-Cas podría ser el mayor logro del siglo XXI.

En 2020, la microbióloga francesa Emmanuelle Charpentier y la bióloga norteamericana Jennifer Doudna recibieron el Premio Nobel de Química por “desarrollar un nuevo método de edición genética” basado en CRISPR-Cas9 (Figura 34). En 2015, ambas habían ya obtenido el Premio Princesa de Asturias de Investigación Científica y Técnica. Relegado quedó el científico lituano Virginijus Šikšnys (Figura 34) cuyo trabajo, en el cual se indicaba textualmente que CRISPR-Cas9 podía “allanar el camino para la ingeniería de RNA guía programable de uso universal”, fue rechazado por la revista Cell en abril de 2012, sin pasar siquiera al proceso de revisión. Los autores tuvieron que esperar a septiembre de 2012 para lograr que fuera publicado, en concreto por *Proceedings of the National Academy of Sciences* [140]. Por el contrario, acelerando el proceso de revisión, el artículo de Doudna, Charpentier y colaboradores demostrando que la proteína Cas9 podía ser programada para editar DNA, fue publicado *on line* por Science a finales de junio de 2012 [141].

Con esto finaliza la primera parte de mi discurso de ingreso en la Academia Asturiana de Ciencia e Ingeniería, no sin antes advertir que “*Si no te gustan las bacterias, te encuentras en el planeta equivocado*” (Stewart Brand; 1938-) y extender la afirmación a las arqueas y los virus.

9. Las bacterias, los virus y yo

“Elige un trabajo que te guste y no tendrás que trabajar ni un día de tu vida.”
Confucio (551-478 aC)

Pretendí dejar claro hasta ahora el enorme interés y potencial aplicado de procariontes y virus, cuyo estudio incide en todos los campos de la Biología. A continuación me centraré en la modesta aportación de mi investigación a alguno de estos campos, dividiéndola para ello en dos grandes periodos: los años de

Streptomyces y los años de las bacterias patógenas y la resistencia a los antibióticos. En ambos casos, intentaré situar el trabajo realizado en el contexto de lo expuesto en la primera parte del discurso.

9.1. Los años de *Streptomyces*

El género *Streptomyces* incluye bacterias Gram positivas pertenecientes al filo *Actinobacteria*, que destaca por diferentes motivos (Figura 36).

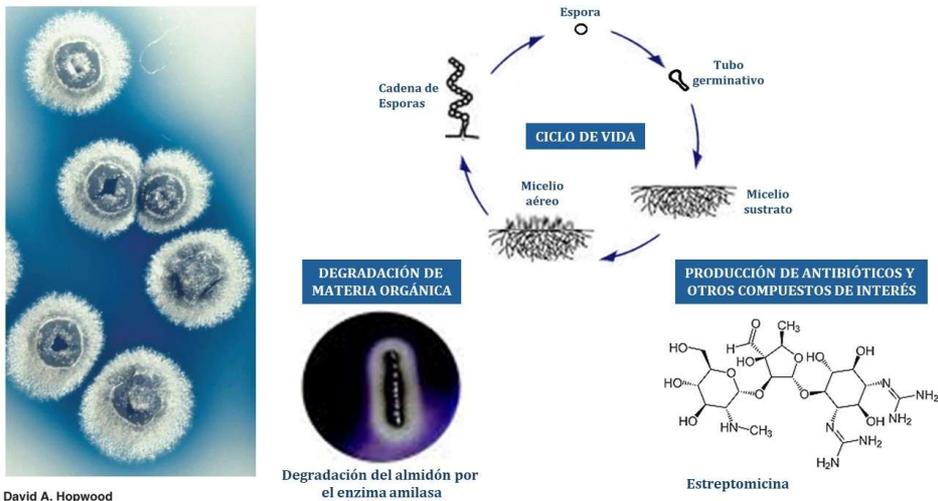


Figura 36. Aspectos destacados del género *Streptomyces*. La fotografía corresponde a colonias pigmentadas de *S. coelicolor*, la especie del género utilizada como modelo desde los pioneros estudios de David Hopwood en el Instituto John Innes, Norwich, Inglaterra.

Las bacterias del género *Streptomyces* se encuentran ampliamente extendidas en el suelo y en sedimentos de sistemas acuáticos, donde desempeñan un importante papel ecológico. Participan activamente en la degradación de la materia orgánica, como polímeros complejos derivados de las plantas (como celulosa y almidón), del exoesqueleto de insectos y de las paredes celulares de los hongos (quitina), gracias a la liberación de enzimas exocelulares [150]. *Streptomyces* destaca además por su ciclo de vida complejo, donde tienen lugar procesos de diferenciación celular. El ciclo se inicia a partir de una espora durmiente, metabólicamente inactiva que en condiciones adecuadas origina uno o más tubos germinativos. Estos se alargan y ramifican dando lugar a filamentos multinucleados que constituyen las hifas del micelio vegetativo o sustrato, especializado en nutrición. En respuesta a la escasez de nutrientes, sobre el micelio vegetativo surge el micelio aéreo o reproductivo, formado por hifas no ramificadas que por fragmentación originan cadenas de esporas unicelulares que finalmente se liberan cerrando el ciclo. Las esporas constituyen la forma de supervivencia, reproducción y dispersión del género [151]. Sin embargo, *Streptomyces* es quizás más conocido por su enorme interés aplicado, debido a la producción de antibióticos y otros muchos compuestos bioactivos, como

agentes antitumorales, inmunosupresores y promotores del crecimiento vegetal, así como una gran variedad de enzimas con aplicación industrial [152]. Por todo ello, la Ingeniería Genética de *Streptomyces* tiene un gran interés, no solo en estudios de Biología Básica, sino también al permitir identificar, caracterizar y manipular las rutas de biosíntesis de compuestos útiles, por ejemplo para incrementar su producción, obtener derivados con propiedades mejoradas y conseguir nuevos productos [153].

Mis años de *Streptomyces* se extendieron desde 1975 hasta 2002, aproximadamente (Figura 37). Comenzaron con mi incorporación al Departamento de Microbiología de la Universidad de Oviedo, donde realicé la Tesis Doctoral bajo la dirección del Profesor Carlos Hardisson y tuvieron continuidad en dos estancias postdoctorales en el Departamento de Genética del Instituto John Innes de Norwich, Inglaterra y en el Departamento de Genética Aplicada de Microorganismos de la Facultad de Biología/Química de la Universidad de Osnabrück en Alemania. Junto con mi investigación predoctoral y postdoctoral, a los estudios de *Streptomyces* contribuyeron, de manera decisiva, las seis Tesis que dirigí a raíz de mi reincorporación al Área de Microbiología del Departamento de Biología Funcional de la Universidad de Oviedo, una vez conseguida una plaza de Profesora Titular de Microbiología.



Figura 37. Tesis doctorales dirigidas durante los años de *Streptomyces*, indicando además mi propia tesis doctoral (parte superior) y estancias postdoctorales (parte inferior). Todas las tesis doctorales fueron realizadas y defendidas en la Universidad de Oviedo, a excepción de la presentada por Patricia Cauch en el Instituto Politécnico Nacional de México, codirigida por la Dra. Rosa María Ribas-Aparicio.

A mediados de la década de 1970, las técnicas de Ingeniería Genética estaban en sus inicios. Yo tuve la oportunidad de seguir paso a paso su evolución y colaborar activamente en su puesta a punto para *Streptomyces*. En concreto, participé en el desarrollo de métodos de transfección para la introducción de DNA recombinante

en protoplastos mediada por liposomas y en la construcción de vectores de clonación de origen fágico. Abordé, además, estudios de interacción bacteriófago/hospedador, prestando especial atención a los sistemas de restricción-modificación. Gracias a ello entre en contacto con el asombroso mundo de los virus y su obligada interacción con las bacterias.

Como ejemplos de la investigación realizada durante este periodo comentaré 1) la aplicación de los liposomas a transfección de protoplastos de *Streptomyces*; 2) el desarrollo de vectores de clonación derivados del bacteriófago Φ C31 de *Streptomyces*; y 3) el amplio trabajo realizado sobre el sistema de restricción-modificación Sall, que demuestra claramente como la Ingeniería Genética puede contribuir a estudios de Biología Molecular y Aplicada.

9.1.1. Aplicación de los liposomas a transfección de protoplastos de *Streptomyces*

Igual que las protocélulas surgidas en la etapa prebiótica, los liposomas son vesículas membranosas que se originan cuando los fosfolípidos se exponen al agua, pudiendo atrapar en su interior agua junto con cualquier sustancia contenida en ella. La fusión de liposomas con protoplastos no solo bacterianos sino también de hongos y de células vegetales, o con células animales, ofrece la posibilidad de introducir en cualquier organismo una gran diversidad de compuestos, como DNA, RNA, agentes antimicrobianos, agentes anticancerígenos, neurotransmisores, etc. [154].

Cuando me incorporé al Departamento de Genética del Instituto John Innes se estaba utilizando polietilenglicol para promover la entrada de DNA en protoplastos de *Streptomyces*. Sin embargo, la frecuencia de transfección era muy baja (10^{-5} - 10^{-6} por molécula de DNA fágico), 10 a 100 veces inferior a la frecuencia de transformación (10^{-4} por molécula de DNA plasmídico). Este hecho dificultaba considerablemente la utilización de vectores fágicos de clonación. Abordamos, por ello, el uso de liposomas como vehículos para introducir DNA fágico en protoplastos obtenidos a partir de micelio vegetativo de *Streptomyces* (Figura 38).

Los resultados confirmaron que los liposomas podían englobar DNA fágico en su interior, pudiendo así transfectar protoplastos con una frecuencia 15 veces superior a la obtenida con DNA libre [155]. Como inconveniente, la cantidad de DNA fágico atrapada en los liposomas era relativamente baja, menos del 10% del añadido inicialmente. Sin embargo, en el transcurso de estos experimentos se encontró que la adición de liposomas vacíos aumentaba considerablemente la frecuencia de transfección con DNA fágico libre. Este proceso se denominó transfección asistida por liposomas [155].

En la estimulación de la transfección estaban implicados liposomas de pequeño tamaño (0,1-0,3 μ m) que permanecen en el sobrenadante después de la centrifugación (los de mayor tamaño se localizan en el sedimento). Además, la estimulación requiere polietilenglicol y depende de la carga de liposomas, siendo

óptima cuando estos poseen carga positiva (Figura 38). En cuanto al mecanismo pensamos que el DNA con carga negativa se une a los liposomas cargados positivamente y éstos, por tratamiento con polietilenglicol se fusionan con los protoplastos permitiendo la incorporación del DNA fágico [155].

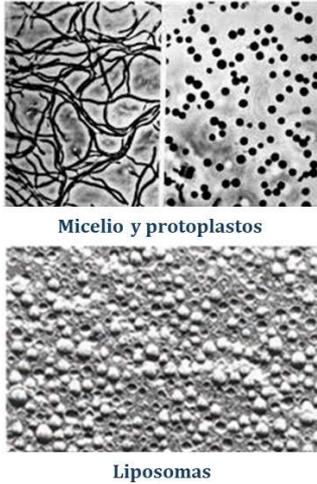


TABLE 3. Effect of liposomal charge on transfection of *S. lividans* 66 protoplasts by free Φ C31 $c1$ DNA in the presence of LSF

LSF added to 2.5 ng of free DNA	Transfection frequency	Stimulation factor over control
None (control) ^a	2.7×10^{-5}	
Neutral ^b	6.6×10^{-5}	2.4
Negatively charged ^b	59×10^{-5}	22
Positively charged ^b	426×10^{-5}	158

^a A 0.5-ml amount of 25% PEG (final concentration, ca. 21%).

^b A 0.5-ml amount of 60% PEG (final concentration, ca. 50%) and 100 μ l of LSF.

Figura 38. Protoplastos obtenidos a partir de micelio vegetativo de *Streptomyces* y liposomas (izquierda). Estimulación de la transfección de protoplastos asistida por liposomas neutros, con carga negativa y con carga positiva (derecha); LSF, *liposome supernatant fluid*; (basado en [155]).

9.1.2. Desarrollo de vectores derivados del bacteriófago Φ C31

Φ C31 es un bacteriófago temperado capaz de multiplicarse mediante el ciclo lítico, originando placas de lisis, o insertar su genoma en el cromosoma bacteriano dando lugar al ciclo lisogénico. Durante este último, el genoma viral, conocido como profago, será copiado y transferido como parte del DNA celular (Figura 39). El genoma de Φ C31 es una molécula de DNA lineal, de doble cadena con extremos cohesivos. En él se identificaron dos regiones dispensables para la formación de placas de lisis. En una de ellas se localiza el gen *c* que codifica el represor necesario para el establecimiento y mantenimiento de la lisogenia. La otra contiene el sitio *attP* que interviene en la integración del DNA fágico en el cromosoma de *Streptomyces* [156].

A partir del genoma de este fago construí una serie de vectores de clonación con deleciones en el gen *c* y en el sitio *attP* (*c-attP*⁻) o solo en el sitio *attP* (*c⁺attP*⁻), quedando así espacio para la inserción de DNA exógeno. En combinación con la transfección asistida por liposomas, estos vectores han sido ampliamente utilizados tanto en clonación convencional (vectores *c-attP*⁻) como en clonación mutacional (vectores *c⁺attP*⁻) (Figura 39). En el primer caso la selección del DNA de interés se basa normalmente en la complementación de mutantes defectivos en el gen o en la ruta que se quiere clonar. En el segundo, la clonación de un fragmento interno de un gen o de una unidad de transcripción y su integración mediante recombinación

homóloga origina un mutante fácilmente seleccionable. Este mutante podrá ser utilizado directamente para estudiar la función del gen u operón intactos, o como receptor para la clonación de estos por complementación funcional [156, 157].

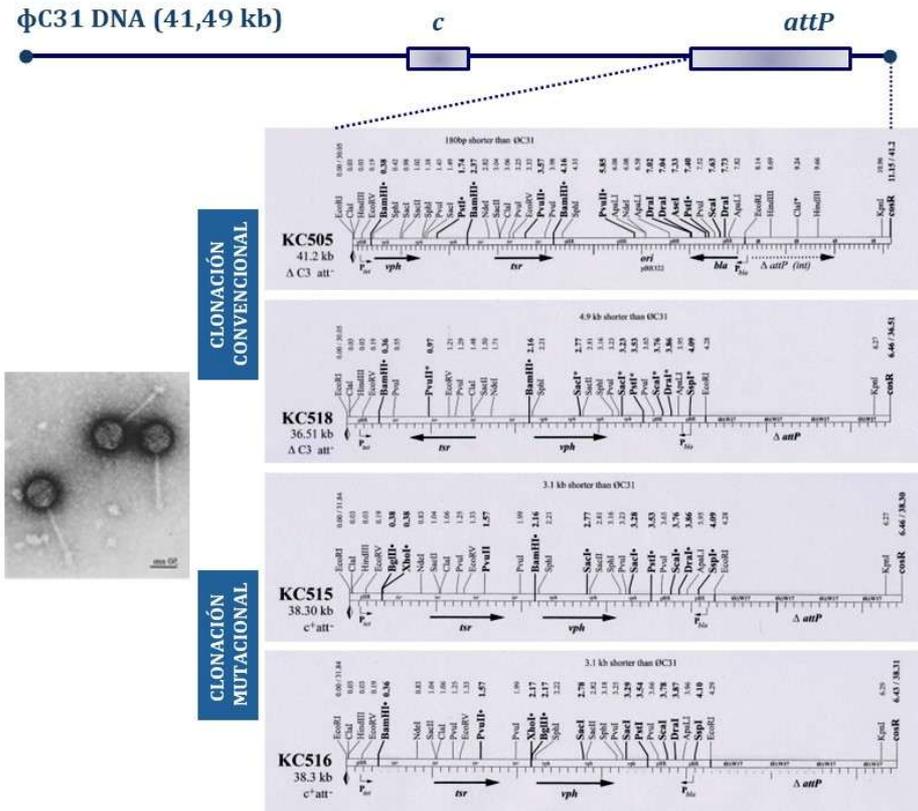


Figura 39. Vectores de clonación derivados del bacteriófago Φ C31 (mostrado a la izquierda) con aplicación en clonación convencional y mutacional (basado en [157]).

9.1.3. El sistema de restricción-modificación Sall de *Streptomyces albus* G

La endonucleasa Sall es uno de los enzimas de restricción utilizados normalmente en Ingeniería Genética. Este enzima, producido por *S. albus* G y descubierto por Richard J. Roberts en 1978 [158], reconoce la secuencia 5'-GTCGAC-3' en DNA de doble cadena y corta en ambas cadenas generando extremos cohesivos. La endonucleasa de restricción se encuentra acompañada *in vivo* por un enzima de modificación, detectado por Keith Chater en el Instituto John Innes de Norwich [159], que protege al DNA propio mediante metilación de las adeninas presentes en la secuencia de reconocimiento (Figura 40). El grupo de Keith Chater había obtenido diversos mutantes en el sistema Sall, destacando entre ellos los dobles mutantes deficientes en restricción y modificación, que aparecen con una frecuencia relativamente elevada (0,05% de los supervivientes al tratamiento con luz

ultravioleta o nitrosoguanidina), y un mutante sensible a la temperatura que crece normalmente a 28°C pero es incapaz de hacerlo por encima de 34,5°C [159].

Mediante técnicas de Ingeniería Genética llevé a cabo la clonación de los genes *salIR* y *salIM* a partir de una librería de DNA de *S. albus* G construida en un vector plasmídico (Figura 40). Como bacteria receptora utilicé *S. lividans*, que es sensible al bacteriófago ΦC31 [160]. Cabe destacar que tanto el vector de clonación como el DNA de ΦC31 contienen sitios de reconocimiento para la endonucleasa Sall. La selección inicial se basó en la detección del gen *salIR*, capaz de conferir a *S. lividans* resistencia frente al bacteriófago. De acuerdo con lo esperado, el plásmido recombinante seleccionado fue resistente a la digestión con Sall, lo que demuestra la clonación simultánea del gen de modificación. A continuación, se llevó a cabo la secuenciación del DNA clonado utilizando el método original de Sanger [122]. Así se demostró que los genes *salIR* y *salIM* se localizan en la misma cadena del DNA cromosómico, precediendo el de restricción al de modificación [161].

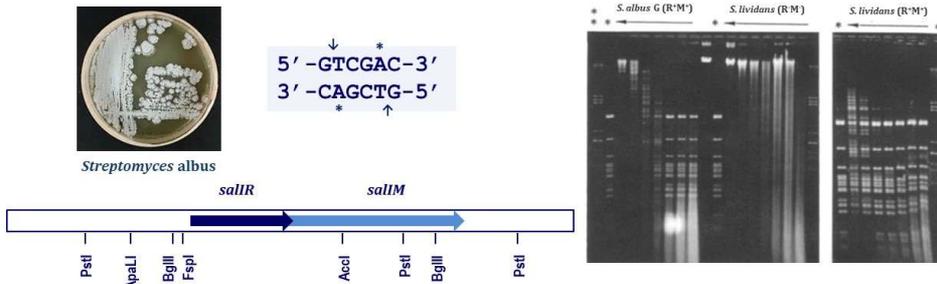


Figura 40. Secuencia de reconocimiento del sistema de restricción-modificación Sall producido por *Streptomyces albus* G y organización de los genes que lo codifican, establecida mediante clonación y secuenciación (izquierda). A la derecha se muestra la digestión del DNA de ΦC31 por extractos de *S. albus* G y de *S. lividans* portador de los genes clonados en un vector plasmídico (ambos R⁺M⁺) pero no por *S. lividans* (R⁻M⁻) utilizado como receptor en el experimento de clonación (basado en [160, 161]).

Los distintos mutantes de *S. albus* G afectados en el sistema de restricción-modificación se transformaron con el plásmido portador de los genes *salI* clonados, comprobándose en todos los casos la complementación, esto es, la restauración del fenotipo silvestre. Además, mediante experimentos de hibridación, clonación y secuenciación se demostró que la frecuente aparición de dobles mutantes deficientes en restricción y modificación se debe a la transposición de una secuencia de inserción de 887 pb, denominada IS112, dentro del gen *salIR*. La inserción de IS112 provoca un cambio en la pauta de lectura de *salIR* y ejerce un efecto polar sobre la expresión de *salIM* [162] (Figura 41). De la misma manera, la clonación y secuenciación de los genes *salI* del mutante sensible a la temperatura permitió identificar un cambio puntual en el nucleótido 4079 del gen *salIM* que provoca la sustitución de la Thr₄₁₆ por Ile y que es responsable del mencionado fenotipo. Este

cambio afecta al dominio de reconocimiento de secuencia del enzima de modificación, identificado en base a estudios comparativos [163] (Figura 41).

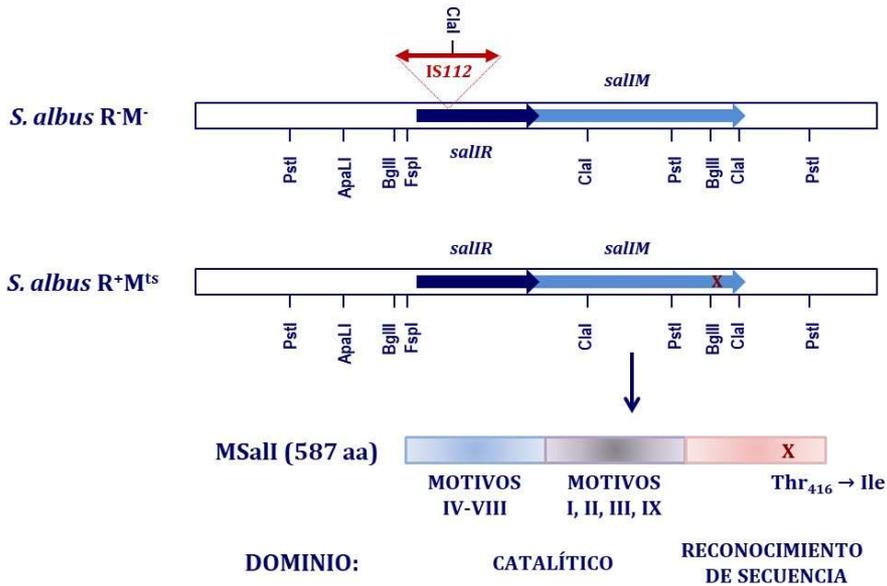


Figura 41. Bases genéticas de la frecuente aparición de un doble mutante deficiente en restricción y modificación y de un mutante sensible a la temperatura, ambos fenotipos complementados por los genes *salIR* y *salIM* clonados [162, 163].

Posteriormente se abordó el análisis transcripcional del sistema, en el marco de la tesis doctoral de Miguel Ángel Álvarez (Figura 42). El estudio demostró que ambos genes constituyen un operón, formándose un RNAm bicistrónico (con información para los dos enzimas), que se transcribe principalmente a partir de un promotor, denominado pR1, localizado en la región 5' del gen *salIR*. Dos posibles promotores minoritarios (pR2 y pR3), anteriores a pR1, podrían contribuir también a la transcripción del RNAm bicistrónico. Además, en la región 5' del gen *salIM* se detectó un promotor adicional, pM, a partir del cual se transcribe un RNAm monocistrónico con información solo para el enzima de modificación. Este promotor, relativamente débil, podría desempeñar un papel esencial en la regulación del sistema SalI, al permitir la expresión de la metiltransferasa en ausencia de la endonucleasa [164].

Los promotores pR y pM se detectaron mediante mapeo de alta resolución con nucleasa S1 junto con secuenciación por el complejo método de Maxam and Gilbert [121]. Esta técnica permite establecer el sitio de iniciación de la transcripción e identificar, por tanto, las regiones -10 y -35 de los promotores. pR1 y pM fueron visualizados también mediante transcripción in vitro utilizando RNA polimerasa purificada de *S. lividans* y a través de fusiones transcripcionales [164]. Sin embargo, pR2 y pR3 no pudieron ser detectados por las dos últimas técnicas.

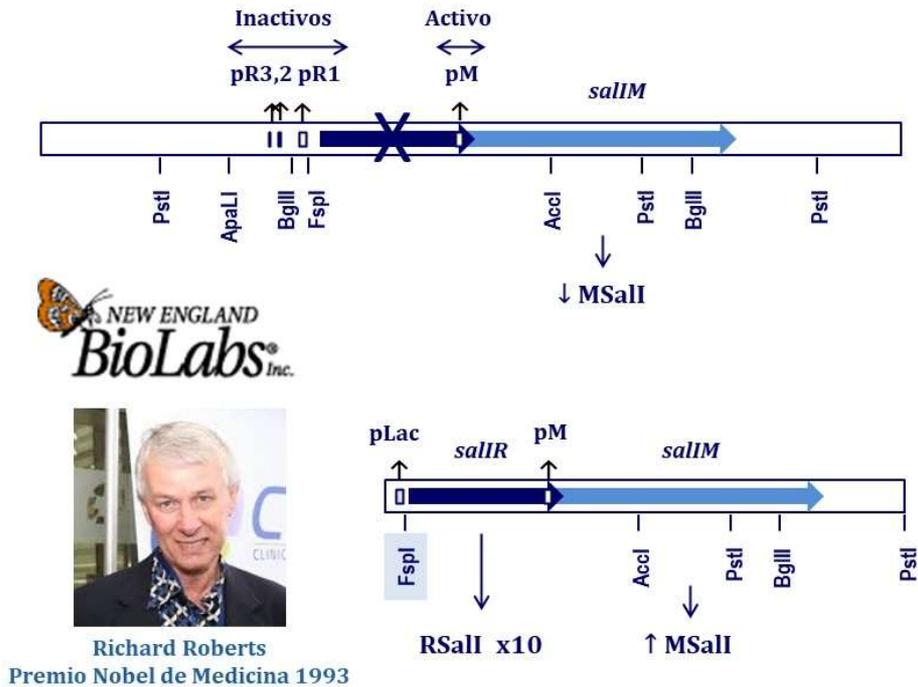


Figura 42. Organización transcripcional del sistema *Sall* e identificación de los promotores implicados en la expresión de los genes *sallR* y *sallM* de *Streptomyces albus* G. Los promotores fueron detectados mediante mapeo con nucleasa S1 y secuenciación Maxam and Gilbert (izquierda) y mediante transcripción in vitro utilizando como plantillas diferentes fragmentos de la región *sall* (derecha); [164]].

También se estudió la expresión del sistema *Sall* en *E. coli*, encontrándose importantes diferencias con respecto a *Streptomyces* (Figura 43). Así, en el hospedador heterólogo, el gen *sallR* no se expresa debido, al menos en parte, a la baja o nula actividad de la región promotora pR. Por el contrario, pM es funcional permitiendo una baja expresión del gen de modificación. Además, la sustitución de la región promotora pR por el promotor pLac de *E. coli* permitió la expresión del gen de restricción y, de acuerdo con la organización de los genes en un operón, aumentó la expresión del gen de modificación. La producción de la endonucleasa *Sall* en la cepa resultante fue unas 10 veces superior a la obtenida con el clon de *S. lividans* portador de los genes *sallR* y *sallM* en multicopia bajo el control de su propia región promotora [165].

Tanto la secuenciación de los genes que codifican el sistema *Sall* como los estudios de expresión en *E. coli* se llevaron a cabo en colaboración con New England BioLabs, empresa líder en el descubrimiento y desarrollo de reactivos necesarios en Biología Molecular, que pasó a producir *Sall* comercial a partir de nuestro clon de *E. coli*. Por aquel entonces, New England BioLabs contrató como director de investigación a Richard J. Roberts (Figura 43), pionero en el descubrimiento de enzimas de restricción de tipo II, entre ellos *Sall*. Cabe destacar que, junto con Philip Sharp, Richard Roberts recibió el Premio Nobel de Medicina en 1993, no por su trabajo con la endonucleasa *Sall*, sino por el descubrimiento de intrones de genes

eucariotas, cuyo procesamiento permite el “ensamblaje alternativo” de distintos exones, dando lugar a la producción de diferentes proteínas a partir de un mismo gen.



Richard Roberts
Premio Nobel de Medicina 1993

Figura 43. Expresión del sistema Sall de *Streptomyces albus G* en *Escherichia coli* (basado en [165]). El estudio se realizó en colaboración con la empresa New England BioLabs, cuyo director de investigación es Richard Roberts.

9.1.4. Otros estudios

Durante los años de *Streptomyces* se abordó también el aislamiento de bacteriófagos de *S. antibioticus* y de otras especies del género a partir de muestras naturales, se procedió a su caracterización, se estudió su interacción con sistemas de restricción-modificación y se manipuló uno de ellos para su utilización como vector de clonación, todo ello formando parte de la primera Tesis Doctoral que dirigí [166, 167]. *S. antibioticus*, bacteria productora del antibiótico oleandomicina del grupo de los macrólidos, fue la especie utilizada como modelo en el Departamento de Microbiología de la Universidad de Oviedo desde su creación. En el contexto de otras Tesis Doctorales, llevamos a cabo el estudio de isoesquizómeros de Sall, esto es de sistemas que reconocen la misma secuencia que Sall como XamI y HgiDII [168, 169] y la caracterización estructural y funcional del gen *recR* de *S. lividans*, que participa en procesos de recombinación homóloga y reparación [170]. También participé en el estudio de proteínas ribosómicas, en colaboración con el grupo de José Antonio Salas y Carmen Méndez de la Universidad de Oviedo [171, 172] y de

una quitinasa de *Streptomyces*, durante mi estancia en la Universidad de Osnabrück, Alemania, identificando mediante mutagénesis dirigida aminoácidos implicados en la unión del enzima al sustrato (Figura 44).

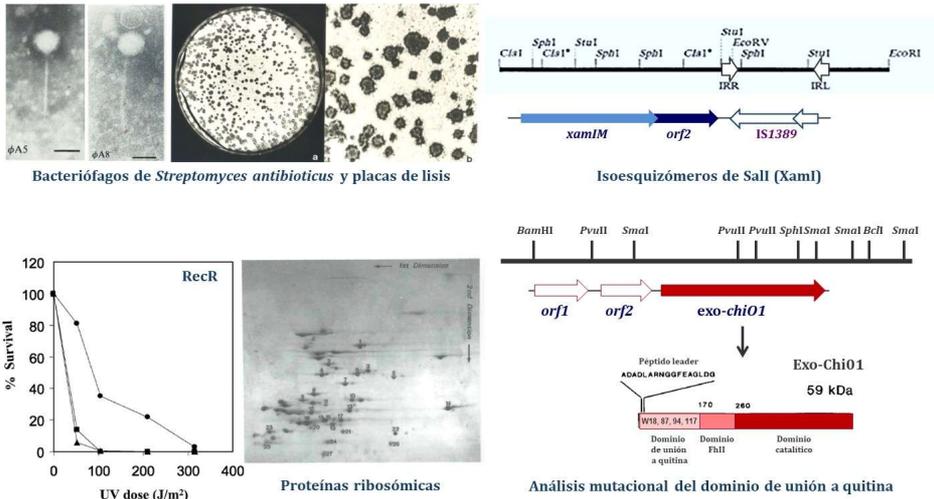


Figura 44. Otras líneas de investigación abordadas durante los años de *Streptomyces* (basado en [166, 168, 169, 171] o elaboración propia).

Después de los años de *Streptomyces* y antes de centrarme en bacterias patógenas y resistencia a los agentes antimicrobianos, realicé una breve incursión en Microbiología Ambiental, trabajando en colaboración con Jesús Sánchez en la identificación de bacterias implicadas en la depuración de lixiviados procedentes de residuos sólidos urbanos de Asturias.



FACULTAD DE BIOLOGÍA
Universidad de Oviedo



FACULTAD DE MEDICINA
Universidad de Oviedo



INSTITUTO JOHN INNES
Norwich, Inglaterra



FACULTAD DE BIOLOGÍA/QUÍMICA
Universidad de Osnabrück

9.2. Los años de las bacterias patógenas y la resistencia a los antimicrobianos

Hacia 2002 me incorporé como codirectora al grupo de investigación puesto en marcha por Carmen Mendoza, Catedrática de Microbiología de la Universidad de Oviedo, centrado en el estudio de bacterias patógenas de interés clínico y agroalimentario y su resistencia. Los resultados obtenidos durante esta etapa derivan en su mayor parte de las 16 Tesis Doctorales que codirigí o dirigí, apoyados por importantes colaboraciones establecidas a nivel regional, nacional e internacional (Figura 45).



Figura 45. Tesis doctorales codirigidas o dirigidas y colaboraciones establecidas con investigadores de otros centros durante el periodo 2002-2025, centradas en el estudio de bacterias de interés clínico y agroalimentario.

Durante más de dos décadas nuestra investigación se centró en bacterias patógenas de seres humanos, en concreto, *Salmonella enterica*, *E. coli*, bacterias transmitidas por animales de compañía y bacterias del grupo ESKAPE. Las siglas ESKAPE derivan de las iniciales de bacterias particularmente peligrosas dada su virulencia y resistencia a múltiples antibióticos [173]. Estas bacterias se encuentran adaptadas al ambiente hospitalario, siendo hoy por hoy los principales patógenos causantes de infecciones asociadas a la asistencia sanitaria. Abordamos, además, la caracterización de bacterias que originan infecciones en plantas de interés

agroalimentario en el Principado de Asturias, como *Pseudomonas* fitopatógenas (Figura 46).

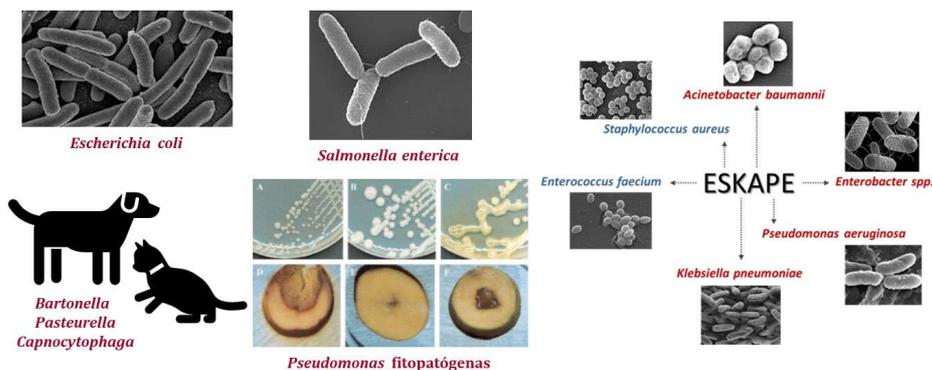


Figura 46. Bacterias cuyo estudio fue abordado por nuestro grupo en el marco de numerosas colaboraciones.

A continuación, presentaré algunos ejemplos del trabajo realizado, relacionándolo, al igual que en el caso anterior, con lo expuesto en la primera parte del discurso.

9.2.1. *Salmonella enterica*

S. enterica es una bacteria patógena, Gram negativa, que desde el punto de vista médico se clasifica en serotipos (esto es, variantes establecidas en base a su composición antigénica) tifoideos y no tifoideos. Los serotipos tifoideos están adaptados a seres humanos, ocasionando infecciones invasivas graves que ocurren principalmente en países en vías de desarrollo. Por el contrario, los serotipos no tifoideos son bacterias zoonóticas, que cuentan con reservorio animal. En seres humanos, estos serotipos constituyen una de las principales causas de infecciones bacterianas transmitidas por alimentos, dando lugar a gastroenteritis. En adultos sanos la infección es generalmente controlada por el sistema inmune a nivel intestinal por lo que no requiere tratamiento con agentes antibacterianos. Sin embargo, en niños, ancianos y personas inmunocomprometidas las bacterias se pueden dispersar a otras partes del cuerpo, provocando infecciones extraintestinales focales o sistémicas, potencialmente graves e incluso mortales. En estos casos, la administración de antibióticos resulta esencial. Durante mucho tiempo los compuestos de elección fueron ampicilina, amoxicilina/ácido clavulánico, cloranfenicol y cotrimoxazol (combinación de trimetoprim y sulfametoxazol). Sin embargo, el aumento en la resistencia frente a éstos y otros antibacterianos tradicionales está limitando su uso, siendo necesario recurrir con frecuencia a nuevos agentes, como las cefalosporinas de amplio espectro, las cefamicinas o las fluoroquinolonas. Estos antibióticos son considerados por la OMS como de importancia crítica y máxima prioridad en medicina humana. Desgraciadamente, también están apareciendo resistencias frente a ellos [174, 175].

Trabajando en colaboración con el Laboratorio de Salud Pública del Principado de Asturias, el Centro Nacional de Microbiología, dependiente del Instituto de Salud Carlos III, y diferentes hospitales, llevamos varias décadas realizando el seguimiento epidemiológico de los serotipos no tifoideos de *S. enterica* en Asturias e investigando su resistencia. Utilizamos para ello numerosos métodos experimentales, tanto convencionales como moleculares, complementados con secuenciación y análisis genómico. Fuimos así testigos del auge y declive de diversas variantes o clones multirresistentes, asociados probablemente al uso de agentes antibacterianos a lo largo del tiempo en diferentes contextos.

Como muestra del amplísimo trabajo realizado, me centraré en clones detectados en Asturias con resistencia plasmídica y/o cromosómica, pertenecientes a los tres serotipos más frecuentemente implicados en infecciones humanas: Enteritidis, Typhimurium y una variante monofásica de este último. Typhimurium es un serotipo bifásico que expresa dos variantes alternativas de flagelina, la proteína estructural de los flagelos bacterianos, mientras que la variante monofásica solo sintetiza una de ellas. La variante monofásica incluye varios clones entre los que destacan el clon español y el clon europeo, que fueron inicialmente detectados en 1997 en España y en 2005 en Europa, respectivamente. Sin entrar en detalle, estudios similares se llevaron a cabo para otros muchos serotipos, centrándonos no solo en Asturias sino también en otras regiones de España.

9.2.1.1. Asociación de genes de virulencia y resistencia en plásmidos de los serotipos Typhimurium y Enteritidis

Un número reducido de serotipos no tifoideos de *S. enterica*, entre los que se incluyen Typhimurium y Enteritidis, contienen plásmidos de virulencia específicos [176]. Estos plásmidos varían considerablemente en cuanto a tamaño y contenido genético, pero todos comparten un locus altamente conservado, denominado *spv* (*Salmonella* plásmido virulencia; *Salmonella plasmid virulence*; *spvRABCD*), que facilita la proliferación intracelular de esta bacteria durante la fase extraintestinal de la enfermedad, contribuyendo a la infección sistémica [177].

Los plásmidos de virulencia específicos de Typhimurium (94 kilobases [kb]) y Enteritidis (60 kb), se denominan pSLT y pSEV, respectivamente. Ambos evolucionan activamente perdiendo y/o ganado información genética. De especial interés es la captura de genes de resistencia mediada mayoritariamente por elementos genéticos móviles, como integrones, secuencias de inserción, transposones y pseudo-transposones (apartado 6.2). También se han detectado plásmidos de resistencia que han adquirido genes de virulencia, incluido el locus *spv*. Ambos tipos de plásmidos híbridos han sido ampliamente caracterizados por nuestro grupo [178]. Como ejemplos relevantes me centraré en los clones portadores de pUO-StVR2 y pUO-SeVR1, donde pUO deriva de plásmido Universidad de Oviedo.

pUO-StVR2 fue descubierto en aislados multirresistentes de *Typhimurium* detectados por primera vez en Asturias durante la década de 1990 [179]. Posteriormente aparecieron en muchas otras regiones de España, alcanzando una elevada frecuencia en la segunda mitad de la década de 2000 [180, 181], y en otros países europeos, como Portugal, Italia y Reino Unido [182-184]. Se trata de un plásmido de 132 kb, conjugativo y movilizable, con capacidad de transferencia horizontal además de vertical [185].

La secuenciación de pUO-StVR2 demostró su evolución a partir de pSLT, que adquirió un segmento de DNA exógeno que consta de una isla de resistencia central flanqueada por dos regiones adicionales [186].

La isla confiere resistencia a varios antibióticos (ampicilina, cloranfenicol, estreptomycin-espectinomycin, sulfonamidas, tetraciclina) y también a compuestos derivados de amonio cuaternario y de mercurio, todos ellos agentes antibacterianos de uso tradicional (Figura 47). Los genes responsables son aportados por un integrón de clase 1 embebido en el transposón Tn21 y por los transposones Tn9 y Tn10. Destaca, además, la presencia de tres copias de la secuencia de inserción IS1, dos de las cuales flanquean la isla de resistencia que podría movilizarse como transposón compuesto.

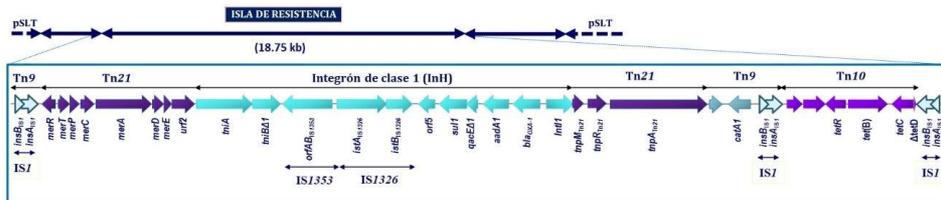


Figura 47. Isla de resistencia del plásmido pUO-StVR2 formada por un mosaico de elementos genéticos móviles portadores de genes de resistencia (elaboración propia).

Junto con la región de resistencia, pUO-StVR2 contiene genes que codifican un sistema de captación de hierro, delimitados por una copia intacta y otra trunca de IS26 (Figura 48). El hierro es un micronutriente esencial para la inmensa mayoría de los seres vivos, al formar parte de numerosas proteínas, por ejemplo, enzimas implicados en reacciones redox o en detoxificación [187]. Las bacterias pueden adquirirlo del medio como ion férrico (Fe^{3+}) o como ion ferroso (Fe^{2+}), siendo este último la forma biológicamente activa que se incorpora en las proteínas. Aunque el hierro es uno de los elementos más abundantes en la Tierra, su disponibilidad es limitada en la mayoría de los lugares, incluido el cuerpo humano, al encontrarse mayoritariamente en forma insoluble o secuestrado por proteínas. Por ello, los microorganismos han desarrollado sistemas de alta afinidad de captación de hierro que en el caso de las bacterias patógenas actúan como factores de virulencia.

Nuestro trabajo no solo demostró que el plásmido pUO-StVR2 codifica un sistema de alta afinidad de captación de Fe^{2+} , sino también que este sistema confiere una

ventaja adaptativa a las bacterias portadoras, tanto en condiciones no infectivas (medios de cultivo de laboratorio con concentraciones limitantes de hierro) como infectivas, al aumentar la capacidad de invasión de células epiteliales humanas y de replicación en el interior de macrófagos [188] (Figura 48). Este estudio se realizó en el marco de la Tesis Doctoral de Vanesa García que fue codirigida, en régimen de cotutela, por el Profesor Michael Hensel de la Universidad de Osnabrück, una de las máximas autoridades a nivel mundial en estudios de virulencia de *S. enterica*.

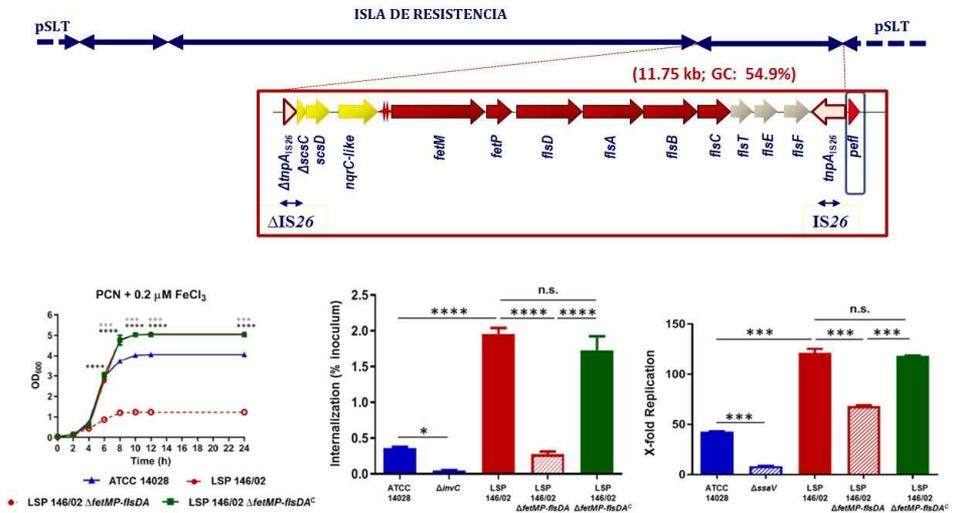


Figura 48. Organización de los genes de pUO-StVR2 que codifican el sistema de captación de Fe²⁺ (parte superior). La comparación de la cepa silvestre con un mutante carente del sistema demostró la ventaja adaptativa conferida tanto en condiciones no infectivas (reproducción en medio de cultivo de laboratorio bajo condiciones limitantes de hierro; parte inferior izquierda) como infectivas (invasión de células epiteliales humanas y replicación en el interior de macrófagos; parte inferior central y derecha, respectivamente). La significación estadística se indica con asteriscos: (****p < 0.0001; ***p < 0.001; **p < 0.01; *p < 0.05; n.s., no significativo (modificado de [188]).

Otro plásmido de virulencia-resistencia ampliamente caracterizado por nuestro grupo es pUO-SeVR1, de 100 kb, perteneciente al serotipo Enteritidis. Deriva de pSEV que adquirió genes de resistencia a seis antibióticos, así como a compuestos derivados de amonio cuaternario, con implicación de un integrón de clase 1, versiones truncadas de varios transposones y numerosas copias de IS26 [189, 190]. Estudios llevados a cabo en colaboración con la Dra. Katie L. Hopkins de la Agencia de Protección de la Salud del Reino Unido (HPA, Health Protection Agency) y con el Dr. Ignácio Mandomando del Centro de Investigaçao em Saude de Manhiça y del Instituto Nacional de Saude, Ministério da Saude de Maputo, en Mozambique, demostraron la presencia de plásmidos similares a pUO-SeVR1 en aislados clínicos de Enteritidis causantes de infecciones invasivas graves tanto en pacientes del Reino Unido, de origen africano o que habían viajado a África, como en niños en Mozambique [190, 191]. La tipificación molecular mediante PFGE de aislados

portadores de estos plásmidos, detectados en España, Reino Unido y Mozambique, demostró la estrecha relación existente entre ellos (Figura 49).

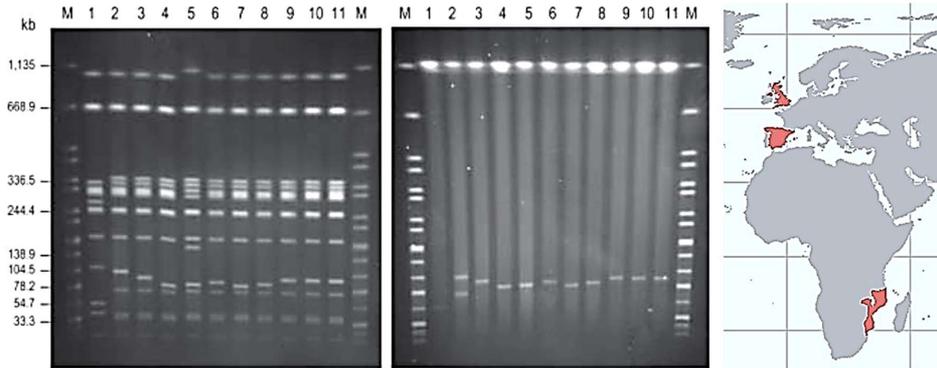


Figura 49. Perfiles XbaI-PFGE de aislados invasivos de *Salmonella enterica* serotipo Enteritidis de origen africano (detectados en España, Reino Unido y Mozambique) y plásmidos relacionados con pUO-SeVR1 presentes en ellos (tomado de [192]).

Desgraciadamente, las infecciones causadas por esta variante de Enteritidis son comunes en países del África sub-Sahariana, afectando principalmente a niños con factores de riesgo, como desnutrición, anemia severa, malaria o infección por el virus del SIDA, y también a adultos inmunocomprometidos, entre ellos los infectados por el VIH. Junto con Enteritidis, variantes de Typhimurium portadoras de plásmidos híbridos derivados de pSLT pero distintos de pUO-StRV2, causan también este tipo de infecciones. Estamos ante una de las muchas consecuencias derivadas de las desigualdades existentes entre países desarrollados y países en vías de desarrollo. En los primeros, Enteritidis y Typhimurium originan principalmente gastroenteritis autolimitada, transmitida por consumo de alimentos de origen animal. En los segundos, la escasez de alimentos, unida a sistemas de salud y condiciones higiénico-sanitarias muchas veces deficientes, han llevado a la evolución y selección de clones multirresistentes de los dos serotipos mayoritarios a nivel mundial, Enteritidis y Typhimurium, que han sabido aprovechar el nicho favorable que representan seres humanos altamente vulnerables. Las infecciones invasivas que originan constituyen un grave problema de salud pública en países del África sub-Sahariana, debido a su elevada tasa de morbilidad y mortalidad [193].

9.2.1.2. Propiedades de resistencia del clon monofásico europeo

Al igual que los clones anteriores el clon monofásico europeo es típicamente resistente a agentes antimicrobianos de uso tradicional. Sin embargo, en este caso los genes responsables se localizan principalmente en el cromosoma, en una región de resistencia denominada RR y en la isla genómica SGI-4 (Figura 50). A diferencia también de los anteriores, el clon europeo adquirió resistencias adicionales frente a antibióticos de gran relevancia en medicina actual, como cefalosporinas de amplio espectro, cefamicinas, fluoroquinolonas y colistina, utilizados como de última línea

tazobactam y ciprofloxacino. Teniendo en cuenta el patrón de resistencia, el tratamiento se desescaló a cefotaxima, pudiéndose controlar la infección. Desafortunadamente el paciente falleció poco después a consecuencia de los problemas neurológicos.

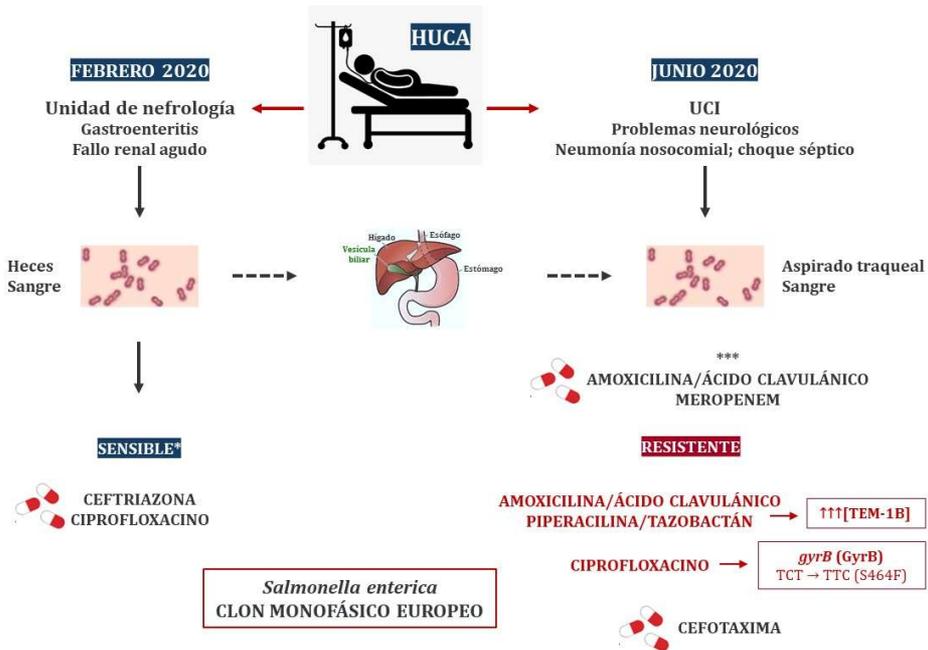


Figura 51. Evolución de resistencia a tiempo real asociada al tratamiento de un paciente ingresado en el Hospital Universitario Central de Asturias. *, sensible a todos los antibióticos utilizados actualmente para el tratamiento de infecciones graves causadas por *Salmonella enterica*. Sin embargo, la secuenciación genómica de las bacterias implicadas demostró la presencia de la región RR que confiere resistencia a ampicilina, estreptomicina, sulfonamidas y tetraciclina; ***, tratamiento empírico (información derivada de [196]).

Dado el interés del caso, los genomas de las bacterias recuperadas de distintas muestras a raíz de los dos ingresos fueron secuenciados. El análisis genómico permitió su asignación al clon monofásico europeo, portador de la región de resistencia RR y SGI1-4. Demostró, además, la estrecha relación existente entre ellos, diferenciándose entre 1 y 4 SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*). En cuanto a las resistencias adquiridas, los genomas de los aislados de junio de 2020, pero no los de febrero, presentaron una mutación puntual en el gen cromosómico *gyrB* que justifica la resistencia a ciprofloxacino. Por otro lado, aunque las bases genéticas de las resistencias a amoxicilina/ácido clavulánico y piperacilina/tazobactam no se pudieron establecer con certeza, estas podrían ser debidas a la superproducción de la β -lactamasa codificada por la región RR del clon europeo.

En conjunto, los resultados apoyan la selección de resistencia a piperacilina/tazobactam y fluoroquinolonas, a raíz del tratamiento del paciente con ceftriaxona y ciprofloxacino durante su primer ingreso en el HUCA. Probablemente,

S. enterica habría alcanzado la vesícula biliar a través de la sangre, donde pudo sobrevivir al tratamiento. Desde ahí se habría dispersado nuevamente dando lugar a la neumonía nosocomial y al choque séptico durante el segundo ingreso. La adquisición de las nuevas resistencias es sumamente relevante, ya que las cefalosporinas de amplio espectro y las fluoroquinolonas son antibióticos de elección para combatir infecciones severas causadas por *S. enterica*. Además, la combinación piperacilina/tazobactam se utiliza para el tratamiento empírico de pacientes críticos ingresados en la UCI. En definitiva, este caso representa un paradigma de cómo la presión selectiva ejercida por la utilización de antibióticos conduce a la rápida adquisición de resistencia.

9.2.2. Resistencia a carbapenemas en bacterias Gram negativas procedentes del Hospital Universitario Central de Asturias

Según se mencionó anteriormente, las carbapenemas, entre las que se incluyen el meropenem y el ertapenem, son antibióticos de última línea reservados para el tratamiento de infecciones graves causadas por bacterias Gram negativas multirresistentes en hospitales. Son por ello categorizados por la OMS como antibacterianos de importancia crítica y máxima prioridad en medicina humana [175]. A lo largo de los años, nuestro grupo realizó el seguimiento y la caracterización de bacterias resistentes a carbapenemas detectadas en el HUCA y pertenecientes a *E. coli* [197, 198], *Enterobacter cloacae* [199, 200], *Klebsiella pneumoniae* [200, 201] y *Acinetobacter baumannii* [202]. Todas ellas son Gram negativas y las tres últimas pertenecen al grupo ESKAPE. Los resultados obtenidos han permitido identificar y caracterizar los clones circulantes, desarrollar técnicas rápidas de detección de estas bacterias resistentes [203-207], determinar factores de riesgo asociados a las infecciones que causan [208] e implementar medidas de control evaluando además su eficacia [202].

Como ejemplo relevante citaré un estudio sobre *E. coli* realizado en colaboración con investigadores del HUCA, la Universidad de Santiago de Compostela (Campus de Lugo), la Universidad de Cantabria y la Plataforma Genómica y Bioinformática del Centro de Investigación Biomédica de la Rioja [197]. El principal valor de esta investigación consistió en la aplicación de herramientas bioinformáticas de última generación para analizar los mecanismos de resistencia a antibióticos en aislados de *E. coli* procedentes de pacientes del HUCA. Además, se procedió a la evaluación de estas técnicas en comparación con herramientas clásicas de Biología Molecular. Las bacterias analizadas eran resistentes a la mayor parte de los antibióticos disponibles, incluyendo las carbapenemas. El gen responsable de la resistencia a estas últimas (*bla_{OXA-48}*), al igual que otros muchos, se localizaron en plásmidos (Figura 52).

El estudio anteriormente citado, en el que también se realizaron ensayos de virulencia en un modelo animal, fue distinguido en 2019 con el Premio Nacional a la mejor publicación científica en el campo de la resistencia a antibióticos, convocado

por la Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios a través del Plan Nacional frente a la Resistencia a los Antibióticos (PRAN). Las colaboraciones establecidas se mantuvieron desde entonces, culminando recientemente en el proyecto de investigación “Monitorización integrada del flujo de resistencias a antimicrobianos (RAM) y dianas de intervención del medio ambiente, a la granja y a la mesa”, enmarcado dentro de la iniciativa “Una Salud” puesto en marcha por diferentes organizaciones a nivel mundial [209]. Ese proyecto, liderado por la Dra. Azucena Mora del Campus de Lugo, ha recibido el premio PRAN 2024 en la categoría de “Mejor iniciativa de investigación de la resistencia a los antibióticos” (Figura 52).



Figura 52. Reconstrucción del genoma de un aislado de *Escherichia coli* resistente a múltiples antibióticos incluidas las carbapenemas (izquierda). La reconstrucción, llevada a cabo con PLACNETw (<https://castillo.dicom.unican.es/upload/>), identifica el cromosoma (óvalo mayor) y dos plásmidos (óvalos de menor tamaño), uno de ellos portador del gen *bla*_{OXA-48} de resistencia a carbapenemas. Concepto “Una Salud” de la OMS que reconoce la interdependencia existente entre salud humana, animal y del medio ambiente (derecha). El Plan Nacional frente a la Resistencia a los Antibióticos (PRAN) nos concedió el premio a la mejor publicación y a la mejor iniciativa en investigación sobre resistencia en los años 2019 y 2024, respectivamente (centro).

9.2.3. Resistencia a antibióticos de última línea en bacterias Gram positivas

Todas las bacterias patógenas comentadas anteriormente son Gram negativas. Sin embargo, nuestra investigación abordó también el estudio de importantes patógenos Gram positivos. En concreto nos centramos en las dos principales especies del género *Staphylococcus*: *S. aureus* y *S. epidermidis* y en *Enterococcus faecium*, dos de las cuales pertenecen al grupo ESKAPE. Prestamos especial atención a la resistencia a antibióticos de última línea para el tratamiento de infecciones graves causadas por estas bacterias, como son la meticilina, la vancomicina y el linezolid [175].

9.2.3.1. *Staphylococcus aureus*

S. aureus es una bacteria comensal y patógena de seres humanos y animales. En seres humanos es principalmente un miembro inofensivo de la microbiota normal de la región naso-faríngea, aunque puede aparecer también en la piel y otras partes del cuerpo. Como patógeno, origina mayoritariamente infecciones localizadas a nivel de la piel, pero también infecciones focales profundas e infecciones invasivas graves (bacteriemia y septicemia), potencialmente mortales. Causa además diversas enfermedades asociadas a la actuación de toxinas específicas, como el síndrome del

shock tóxico, el síndrome de la piel escaldada y la intoxicación alimentaria estafilocócica. Aunque *S. aureus* es principalmente un patógeno nosocomial, puede también actuar a nivel de comunidad.

Dada la importancia de *S. aureus* como patógeno de seres humanos y centrándonos en Asturias, nuestro grupo aplicó numerosas técnicas de tipificación molecular al estudio de una amplia colección de aislados procedentes de pacientes ingresados en dos hospitales (HUCA y Monte Naranco; 210-212), de portadores sanos (alumnos de la Facultad de Biología y manipuladores de alimentos) así como de alimentos (213-215). Esto permitió identificar los complejos clonales y clones que están circulando en nuestra región (Figura 53).

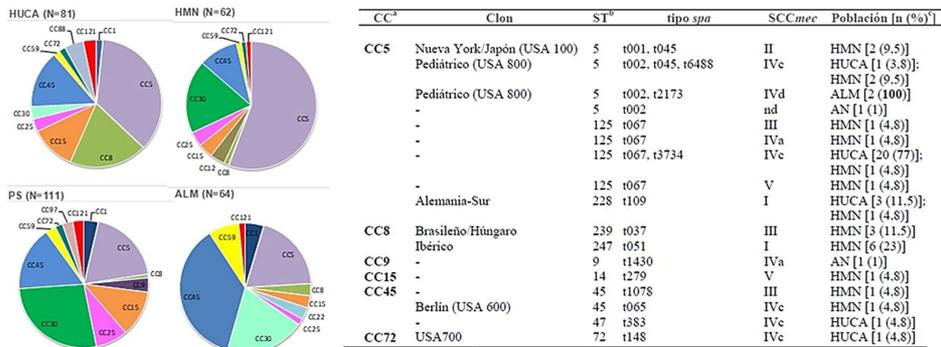


Figura 53. Distribución en complejos clonales de *Staphylococcus aureus* (izquierda) y de clones resistentes a metilina (derecha) detectados en Asturias. HUCA, Hospital Universitario Central de Asturias; HMN, Hospital Monte Naranco, PS, portadores sanos; ALM, alimentos y manipuladores de alimentos. Un complejo clonal (CC) agrupa aislados cuyas secuencias tipo (ST) solo se diferencian en uno o dos de los siete loci incluidos en el esquema de tipificación MLST. *spa*, proteína A estafilocócica; SCC*mec*, casete cromosómico estafilocócico de resistencia a metilina; -, sin nombre asignado; nd, no determinado; N y n, número de aislados [216].

Cabe destacar el elevado porcentaje de resistencia a β -lactámicos, aminoglicosidos, macrólidos y lincosamidas y de multiresistencia detectado en aislados clínicos con respecto a los procedentes de portadores sanos y alimentos. La identificación del tipo de casete cromosómico SCC*mec* responsable de la resistencia a metilina, antibiótico β -lactámico de gran importancia en el tratamiento de infecciones producidas por esta bacteria, junto con la tipificación molecular, permitió identificar los clones de *S. aureus* resistentes a este antibiótico (MRSA; *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*) relevantes en Asturias. Todos los aislados investigados presentaron un gran número de genes de virulencia asociados a numerosos elementos genéticos móviles (islas genómicas, islas de patogenicidad, profagos, y plásmidos). En conjunto, los resultados obtenidos ponen de manifiesto la elevada plasticidad del genoma de *S. aureus*, lo cual facilita su adaptación a los distintos nichos ecológicos que ocupa. La experiencia obtenida nos permitió publicar una revisión sobre el tema que a mediados de abril de 2025 contaba con más de 800 citaciones [217].

9.2.3.2. *Staphylococcus epidermidis*

Al igual que *S. aureus*, una de cuyas características diferenciales es la producción del enzima coagulasa, los estafilococos coagulasa negativos son importantes patógenos nosocomiales que afectan fundamentalmente a personas inmunocomprometidas o que han requerido algún tipo de implante médico [218]. Dentro de este grupo destaca *S. epidermidis*, que es la bacteria Gram positiva detectada con mayor frecuencia en UCIs de hospitales españoles, ocupando el tercer lugar si se consideran también las bacterias Gram negativas (<http://hws.vhebron.net/envin-helics>). Los aislados nosocomiales de *S. epidermidis* son generalmente resistentes a la mayoría de los agentes antibacterianos utilizados en la práctica médica, incluyendo meticilina y vancomicina. Por ello, para el tratamiento de infecciones graves causadas por esta bacteria hay que recurrir frecuentemente a antibacterianos de último recurso, como el linezolid, perteneciente a la familia de las oxazolidinonas. Sin embargo, en los últimos años la resistencia a linezolid en los estafilococos coagulasa negativos, especialmente en *S. epidermidis*, ha ido en aumento, comprometiendo aún más el manejo de ese tipo de infecciones.

Un estudio correspondiente al periodo 2011-2017, llevado a cabo en el HUCA, mostró una elevada tasa de *S. epidermidis* resistente a linezolid, especialmente en la UCI, donde se observó una correlación estadísticamente significativa con el elevado consumo del antibiótico. En otras unidades, con menor consumo de linezolid, no se encontró relación estadísticamente significativa y la frecuencia de aislados resistentes fue considerablemente inferior (Figura 54).

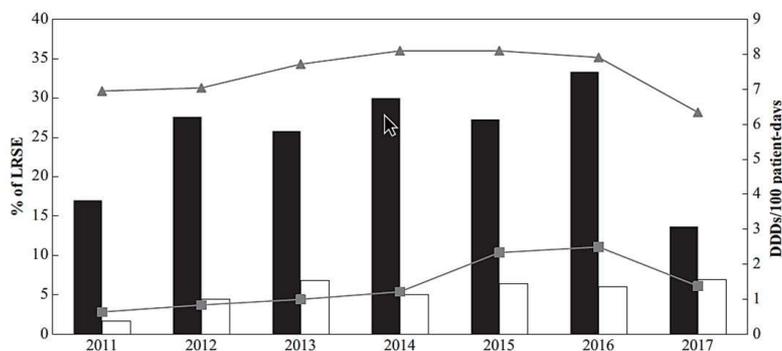


Figura 54. Comparación de la tasa de *Staphylococcus epidermidis* resistentes a linezolid (LRSE) obtenidos de pacientes ingresados en la UCI (barras negras) y otras unidades (barras blancas) del Hospital Universitario Central de Asturias durante el periodo 2011-2017. Se muestra, además, la correlación con el consumo del antibiótico en la UCI (triángulos) y otras unidades (cuadrados) expresado en DDD (dosis diarias definidas)/por 100 pacientes/día [219].

A pesar de ello, la tipificación molecular y los estudios de resistencia de aislados representativos demostraron el mantenimiento de un clon de *S. epidermidis* resistente a linezolid, durante un largo periodo tiempo, no solo en la UCI de HUCA

sino también en muchas otras unidades [219, 220]. En estas últimas, los aislados resistentes pueden colonizar a los pacientes que sí llegan a ingresar en la UCI, donde la presión selectiva es mayor, tendrán más probabilidad de contraer una infección por la bacteria resistente. Ante la gravedad de la situación, en 2017 se establecieron medidas de control, incluyendo la restricción del uso de linezolid limitándolo a casos estrictamente necesarios. Esto provocó una considerable reducción del número de *S. epidermidis* resistentes a linezolid en la UCI y puso de manifiesto la necesidad de extender las medidas a otras unidades del hospital (Figura 54).

Para finalizar, aunque esta última parte del discurso se centró en bacterias patógenas de seres humanos, no puedo dejar de mencionar el excelente trabajo llevado a cabo por Ana González en el SERIDA sobre bacterias fitopatógenas que infectan a cultivos de interés en Asturias [221-223]. Entre otras muchas aportaciones, su investigación, en la cual colaboré a lo largo de las últimas décadas, condujo al descubrimiento de una nueva especie del género *Pseudomonas*, que se denominó *P. asturiensis* en honor a nuestra región [224].

En resumen, el trabajo resultante de nuestra investigación, apoyado por múltiples colaboraciones, ha generado una gran cantidad de información sobre importantes bacterias patógenas que están causando infecciones en Asturias y sobre su resistencia. Esta información, puesta al servicio de las autoridades y el personal sanitario, aporta un claro beneficio para la salud de la sociedad asturiana. Estudios similares fueron llevados a cabo en otras áreas geográficas, tanto de España como de otros países.



Salmonella enterica en Asturias (tomado de [225]).

10. Referencias

1. Arnett D (1996). Supernovae and nucleosynthesis. An investigation of the history of matter, from the Big Bang to the present Princeton University Press: Princeton
2. Montmerle T, Augereau JC, Chaussidon M, Gounelle M, Marty B, Morbidelli A (2006). Solar system formation and early evolution: The first 100 million years. *Earth Moon Planets* **98**: 39-95.
3. Rodriguez LE, Altair T, Hermis NY, Jia TZ, Roche TP, Steller LH, Weber JM (2024). Chapter 4: A geological and chemical context for the origins of life on early earth. *Astrobiology* **24**: S76-S106.
4. Madigan MT, Martinko JM, Bender KS, Buckley DH, Stahl DA (2015). Brock biology of microorganisms. 14 ed.; Pearson Education Limited.
5. Zahnle KJ, Lupu R, Catling DC, Wogan N (2020). Creation and evolution of impact-generated reduced atmospheres of early earth. *Planet Sci J* **1**: 11.
6. Haldane JBS (1929). The origin of life. *Rationalist Annual* **148**: 3-10.
7. Oparin AI (1953). The origin of life. 2 ed.; Dover Publications Inc.
8. Miller SL (1955). Production of some organic compounds under possible primitive earth conditions. *J Am Chem Soc* **77**: 2351-2361.
9. Miller SL (1998). The endogenous synthesis of organic compounds. In *The molecular origins of life: Assembling pieces of the puzzle*, Brack, A, Ed. Cambridge University Press: Cambridge, p^pp a(1998).
10. Cleaves II, James H (2012). Prebiotic chemistry: What we know, what we don't. *Evolution: Education and Outreach* **5**: 342-360.
11. Kitadai N, Maruyama S (2018). Origins of building blocks of life: A review. *Geosci Front* **9**: 1117-1153.
12. Lopez A, Fiore M (2019). Investigating prebiotic protocells for a comprehensive understanding of the origins of life: A prebiotic systems chemistry perspective. *Life (Basel)* **9**.
13. Pinna S, Kunz C, Halpern A, Harrison SA, Jordan SF, Ward J, Werner F, Lane N (2022). A prebiotic basis for ATP as the universal energy currency. *PLoS Biol* **20**: e3001437.
14. Varma SJ, Muchowska KB, Chatelain P, Moran J (2018). Native iron reduces CO₂ to intermediates and end-products of the acetyl-CoA pathway. *Nat Ecol Evol* **2**: 1019-1024.
15. Bonfio C, Godino E, Corsini M, de Biani FF, Guella G, Mansy SS (2018). Prebiotic iron-sulfur peptide catalysts generate a pH gradient across model membranes of late protocells. *Nat Catal* **1**: 616-623.
16. Dalai P, Sahai N (2019). Mineral-lipid interactions in the origins of life. *Trends Biochem Sci* **44**: 331-341.
17. Deamer D, Dworkin JP, Sandford SA, Bernstein MP, Allamandola LJ (2002). The first cell membranes. *Astrobiology* **2**: 371-381.
18. Monnard PA, Walde P (2015). Current ideas about prebiological compartmentalization. *Life (Basel)* **5**: 1239-1263.
19. Schoenmakers LLJ, Reydon TAC, Kirschning A (2024). Evolution at the origins of life? *Life-Basel* **14**: 175.
20. Gesteland RF, Atkins JF (1993). The RNA world: The nature of modern RNA suggests a prebiotic RNA world. Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor.
21. Gilbert W (1986). Origin of life - the RNA world. *Nature* **319**: 618-618.
22. Robertson MP, Joyce GF (2012). The origins of the RNA world. *Csh Perspect Biol* **4**: a003608.

23. Anet FA (2004). The place of metabolism in the origin of life. *Curr Opin Chem Biol* **8**: 654-659.
24. Whittaker RH (1969). New concepts of kingdoms or organisms. Evolutionary relations are better represented by new classifications than by the traditional two kingdoms. *Science* **163**: 150-160.
25. Zuckerkandl E, Pauling L (1965). Molecules as documents of evolutionary history. *J Theor Biol* **8**: 357-366.
26. Woese CR, Kandler O, Wheelis ML (1990). Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 4576-4579.
27. Harris HMB, Hill C (2020). A place for viruses on the tree of life. *Front Microbiol* **11**: 604048.
28. Sagan L (1967). On the origin of mitosing cells. *J Theor Biol* **14**: 255-274.
29. Williams TA, Foster PG, Cox CJ, Embley TM (2013). An archaeal origin of eukaryotes supports only two primary domains of life. *Nature* **504**: 231-236.
30. Spang A, Saw JH, Jorgensen SL, Zaremba-Niedzwiedzka K, Martijn J, Lind AE, van Eijk R, Schleper C, Guy L, Ettema TJG (2015). Complex archaea that bridge the gap between prokaryotes and eukaryotes. *Nature* **521**: 173-179.
31. Imachi H, Nobu MK, Nakahara N, Morono Y, Ogawara M, Takaki Y, Takano Y, Uematsu K, Ikuta T, Ito M, Matsui Y, Miyazaki M, Murata K, Saito Y, Sakai S, Song C, Tasumi E, Yamanaka Y, Yamaguchi T, Kamagata Y, Tamaki H, Takai K (2020). Isolation of an archaeon at the prokaryote-eukaryote interface. *Nature* **577**: 519-525.
32. Spang A, Mahendrarajah TA, Offre P, Stairs CW (2022). Evolving perspective on the origin and diversification of cellular life and the virosphere. *Genome Biol Evol* **14**: evac034.
33. Katz LA (2012). Origin and diversification of eukaryotes. *Annu Rev Microbiol* **66**: 411-427.
34. Baumberg T, Früh-Green GL, Thorseth IH, Lilley MD, Hamelin C, Bernasconi SM, Okland IE, Pedersen RB (2016). Fluid composition of the sediment-influenced Loki's Castle vent field at the ultra-slow spreading Arctic Mid-Ocean Ridge. *Geochim Cosmochim Acta* **187**: 156-178.
35. Nasir A, Romero-Severson E, Claverie JM (2020). Investigating the concept and origin of viruses. *Trends Microbiol* **28**: 959-967.
36. Darwin C (1859). On the origin of species by means of natural selection or the preservation of favoured races in the struggle for life. John Murray, Albemarle Street: London.
37. Crick FH (1968). The origin of the genetic code. *J Mol Biol* **38**: 367-379.
38. Gaidos E, Knoll AH (2012). Our evolving planet: From dark ages to evolutionary renaissance. Cambridge University Press: Cambridge.
39. Martin WF, Weiss MC, Neukirchen S, Nelson-Sathi S, Sousa FL (2016). Physiology, phylogeny, and LUCA. *Microb Cell* **3**: 582-587.
40. Bell EA, Boehnke P, Harrison TM, Mao WL (2015). Potentially biogenic carbon preserved in a 4.1 billion-year-old zircon. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**: 14518-14521.
41. Mojzsis SJ, Arrhenius G, McKeegan KD, Harrison TM, Nutman AP, Friend CR (1996). Evidence for life on earth before 3,800 million years ago. *Nature* **384**: 55-59.
42. Allwood AC, Walter MR, Kamber BS, Marshall CP, Burch IW (2006). Stromatolite reef from the Early Archaean era of Australia. *Nature* **441**: 714-718.

43. Westall F, Brack A, Fairen AG, Schulte MD (2023). Setting the geological scene for the origin of life and continuing open questions about its emergence. *Front Astron Space Sci* **9**: 1095701.
44. Madigan MT, Martinko JM, Dunlap PV, Clark DP (2008). Brock biology of microorganisms 12 ed.; Pearson Education Limited.
45. Moody ERR, Álvarez-Carretero S, Mahendrarajah TA, Clark JW, Betts HC, Dombrowski N, Szánthó LL, Boyle RA, Daines S, Chen X, Lane N, Yang ZH, Shields GA, Szöllosi GJ, Spang A, Pisani D, Williams TA, Lenton TM, Donoghue PCJ (2024). The nature of the last universal common ancestor and its impact on the early Earth system. *Nature Ecology & Evolution* **8**: 1654–1666.
46. Weiss MC, Sousa FL, Mrnjavac N, Neukirchen S, Roettger M, Nelson-Sathi S, Martin WF (2016). The physiology and habitat of the last universal common ancestor. *Nat Microbiol* **1**: 16116.
47. Fuchs G (2011). Alternative pathways of carbon dioxide fixation: Insights into the early evolution of life? *Annu Rev Microbiol* **65**: 631-658.
48. Kowallik KV, Martin WF (2021). The origin of symbiogenesis: An annotated English translation of Mereschkowsky's 1910 paper on the theory of two plasma lineages. *Biosystems* **199**: 104281.
49. Schuchmann K, Muller V (2014). Autotrophy at the thermodynamic limit of life: A model for energy conservation in acetogenic bacteria. *Nat Rev Microbiol* **12**: 809-821.
50. Ferry JG, House CH (2006). The stepwise evolution of early life driven by energy conservation. *Mol Biol Evol* **23**: 1286-1292.
51. Martin W, Russell MJ (2007). On the origin of biochemistry at an alkaline hydrothermal vent. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **362**: 1887-1925.
52. Sousa FL, Thiergart T, Landan G, Nelson-Sathi S, Pereira IA, Allen JF, Lane N, Martin WF (2013). Early bioenergetic evolution. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **368**: 20130088.
53. Martin WF, Bryant DA, Beatty JT (2018). A physiological perspective on the origin and evolution of photosynthesis. *FEMS Microbiol Rev* **42**: 205-231.
54. Raven JA (2009). Contributions of anoxygenic and oxygenic phototrophy and chemolithotrophy to carbon and oxygen fluxes in aquatic environments. *Aquat Microb Ecol* **56**: 177-192.
55. Allen JF, Martin W (2007). Evolutionary biology: Out of thin air. *Nature* **445**: 610-612.
56. Eme L, Spang A, Lombard J, Stairs CW, Ettema TJG (2017). Archaea and the origin of eukaryotes. *Nat Rev Microbiol* **15**: 711-723.
57. Koumandou VL, Wickstead B, Ginger ML, van der Giezen M, Dacks JB, Field MC (2013). Molecular paleontology and complexity in the last eukaryotic common ancestor. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **48**: 373-396.
58. Deutekom ES, Snel B, van Dam TJP (2021). Benchmarking orthology methods using phylogenetic patterns defined at the base of eukaryotes. *Brief Bioinform* **22**.
59. Craig JM, Kumar S, Hedges SB (2023). The origin of eukaryotes and rise in complexity were synchronous with the rise in oxygen. *Front Bioinform* **3**: 1233281.
60. Merino N, Aronson HS, Bojanova DP, Feyhl-Buska J, Wong ML, Zhang S, Giovannelli D (2019). Living at the extremes: Extremophiles and the limits of life in a planetary context. *Front Microbiol* **10**: 780.
61. Rothschild LJ, Mancinelli RL (2001). Life in extreme environments. *Nature* **409**: 1092-1101.
62. Capece MC, Clark E, Saleh JK, Halford D, Heintz N, Hoskins S, et al. (2013). Polyextremophiles and the constraints for terrestrial habitability. In

- Polyextremophiles. Cellular origin, life in extreme habitats and astrobiology*, Seckbach, J, Oren, A, Stan-Lotter, H, Eds. Springer: Dordrecht, p^app a(2013).
63. Knoll A (2015). Life on a young planet: The first three billion years of evolution on Earth. Princeton University Press: Princeton, NJ.
 64. Harrison JP, Gheeraert N, Tsigelnitskiy D, Cockell CS (2013). The limits for life under multiple extremes. *Trends Microbiol* 21: 204-212.
 65. McGrath C (2023). Breaking genetic barriers: Understanding the limits of horizontal gene transfer. *Genome Biology and Evolution* 15.
 66. Avery OT, Macleod CM, McCarty M (1944). Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types: Induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from *Pneumococcus* type III. *J Exp Med* 79: 137-158.
 67. Griffith F (1928). The significance of pneumococcal types. *J Hyg (Lond)* 27: 113-159.
 68. Lederberg J, Tatum EL (1946). Gene recombination in *Escherichia coli*. *Nature* 158: 558.
 69. Zinder ND, Lederberg J (1952). Genetic exchange in *Salmonella*. *J Bacteriol* 64: 679-699.
 70. Emamalipour M, Seidi K, Zununi Vahed S, Jahanban-Esfahlan A, Jaymand M, Majdi H, Amoozgar Z, Chitkushev LT, Javaheri T, Jahanban-Esfahlan R, Zare P (2020). Horizontal gene transfer: From evolutionary flexibility to disease progression. *Front Cell Dev Biol* 8: 229.
 71. Vázquez X, García P, García V, de Toro M, Ladero V, Heinisch JJ, Fernández J, Rodicio R, Rodicio MR (2021). Genomic analysis and phylogenetic position of the complex IncC plasmid found in the Spanish monophasic clone of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Sci Rep* 11: 11482.
 72. García V (2015). Invasive and epidemic potential of emergent multiresistant clones of the food-borne pathogen *Salmonella enterica*. PhD Thesis, Universidad de Oviedo, Oviedo, Spain.
 73. Partridge SR, Kwong SM, Firth N, Jensen SO (2018). Mobile genetic elements associated with antimicrobial resistance. *Clin Microbiol Rev* 31.
 74. Hall JPJ, Harrison E, Baltrus DA (2022). Introduction: The secret lives of microbial mobile genetic elements. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 377: 20200460.
 75. Oulhen N, Schulz BJ, Carrier TJ (2016). English translation of Heinrich Anton de Bary's 1878 speech: 'Die Erscheinung der symbiose'. *Symbiosis* 69: 131-139.
 76. Drew GC, Stevens EJ, King KC (2021). Microbial evolution and transitions along the parasite-mutualist continuum. *Nat Rev Microbiol* 19: 623-638.
 77. Xu P, Wang E (2023). Diversity and regulation of symbiotic nitrogen fixation in plants. *Curr Biol* 33: R543-R559.
 78. Schramm S, Weiss D (2024). Bioluminescence - the vibrant glow of nature and its chemical mechanisms. *Chembiochem* 25: e202400106.
 79. Hwang HH, Yu M, Lai EM (2017). *Agrobacterium*-mediated plant transformation: Biology and applications. *Arabidopsis Book* 15: e0186.
 80. Nester EW (2014). *Agrobacterium*: Nature's genetic engineer. *Front Plant Sci* 5: 730.
 81. Domagk G (1935). Ein Beitrag zur Chemotherapie der bakteriellen Infektionen. *Deutsche Medizinische Wochenschrift* 61.
 82. Fleming A (1929). On antibacterial action of culture of *Penicillium*, with special reference to their use in isolation of *B. influenzae*. *Br. J. Exp. Pathol.* 10: 226-236.
 83. Hutchings MI, Truman AW, Wilkinson B (2019). Antibiotics: Past, present and future. *Curr Opin Microbiol* 51: 72-80.

84. Rodicio MR (2021). Resistencia bacteriana a los antibióticos: ¿pueden dejar de curar?. *Revista Academia Asturiana de Ciencia e Ingeniería* **1**: 21-42.
85. Baquero F, Blázquez J, Martínez JL (2002). Mutación y resistencia a antibióticos. *Investig. Cienc.* **315**: 72-78.
86. WHO (2015). (World Health Organization): Global action plan on antimicrobial resistance. World health organization. Available online at: <https://apps.WHO.Int/iris/handle/10665/193736> global action plan. <https://www.WHO.Int/publications/i/item/9789241509763>.
87. Raina JB, Eme L, Pollock FJ, Spang A, Archibald JM, Williams TA (2018). Symbiosis in the microbial world: From ecology to genome evolution. *Biol Open* **7**: bio032524.
88. Sender R, Fuchs S, Milo R (2016). Are we really vastly outnumbered? Revisiting the ratio of bacterial to host cells in humans. *Cell* **164**: 337-340.
89. Margolles Barros A (2022). El microbioma humano: Un micromundo en nuestro interior. *Revista Academia Asturiana de Ciencia e Ingeniería* **2**: 49-63.
90. Foster JS, Wheeler RM, Pamphile R (2014). Host-microbe interactions in microgravity: Assessment and implications. *Life (Basel)* **4**: 250-266.
91. Moreno-Gómez S, Hochberg ME, van Doorn GS (2023). Quorum sensing as a mechanism to harness the wisdom of the crowds. *Nat Commun* **14**: 3415.
92. Fuqua WC, Winans SC, Greenberg EP (1994). Quorum sensing in bacteria: The luxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J Bacteriol* **176**: 269-275.
93. Flemming HC, Wingender J, Szewzyk U, Steinberg P, Rice SA, Kjelleberg S (2016). Biofilms: An emergent form of bacterial life. *Nat Rev Microbiol* **14**: 563-575.
94. Whiteley M, Diggle SP, Greenberg EP (2017). Progress in and promise of bacterial quorum sensing research. *Nature* **551**: 313-320.
95. Ivanova K, Fernandes MM, Tzanov T (2013). Current advances on bacterial pathogenesis inhibition and treatment strategies. In *Microbial pathogens and strategies for combating them: Science, technology and education*, Méndez-Vilas, Ed. Formatex Research Center: p^app a(2013).
96. Henke JM, Bassler BL (2004). Three parallel quorum-sensing systems regulate gene expression in *Vibrio harveyi*. *Journal of Bacteriology* **186**: 6902-6914.
97. Miller MB, Skorupski K, Lenz DH, Taylor RK, Bassler BL (2002). Parallel quorum sensing systems converge to regulate virulence in *Vibrio cholerae*. *Cell* **110**: 303-314.
98. Baker-Austin C, Oliver JD, Alam M, Ali A, Waldor MK, Qadri F, Martínez-Urtaza J (2018). *Vibrio* spp. Infections. *Nat Rev Dis Primers* **4**: 8.
99. Federle MJ, Bassler BL (2003). Interspecies communication in bacteria. *J Clin Invest* **112**: 1291-1299.
100. Suttle CA (2013). Viruses: Unlocking the greatest biodiversity on Earth. *Genome* **56**: 542-544.
101. Acheson NH (2011). *Fundamentals of Molecular Virology* John Wiley & Sons, Inc. : Hoboken, New Jersey.
102. Luria SE, Darnell JE (1978). In *General Virology*, Hadar, J, Ed. John Wiley & Sons, Inc. : New York, p^app a(1978).
103. Wernegreen JJ (2002). Genome evolution in bacterial endosymbionts of insects. *Nat Rev Genet* **3**: 850-861.
104. Baltimore D (1971). Expression of animal virus genomes. *Bacteriol Rev* **35**: 235-241.
105. Koonin EV, Senkevich TG, Dolja VV (2006). The ancient virus world and evolution of cells. *Biol Direct* **1**:29

106. Bertani G, Weigle JJ (1953). Host controlled variation in bacterial viruses. *J Bacteriol* 65: 113-121.
107. Luria SE, Human ML (1952). A nonhereditary, host-induced variation of bacterial viruses. *J Bacteriol* 64: 557-569.
108. Linn S, Arber W (1968). Host specificity of DNA produced by *Escherichia coli*, X. In vitro restriction of phage fd replicative form. *Proc Natl Acad Sci U S A* 59: 1300-1306.
109. Loenen WA, Dryden DT, Raleigh EA, Wilson GG, Murray NE (2014). Highlights of the DNA cutters: A short history of the restriction enzymes. *Nucleic Acids Res* 42: 3-19.
110. Smith HO, Wilcox KW (1970). A restriction enzyme from *Hemophilus influenzae*. I. Purification and general properties. *J Mol Biol* 51: 379-391.
111. Danna K, Nathans D (1971). Specific cleavage of simian virus 40 DNA by restriction endonuclease of *Hemophilus influenzae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 68: 2913-2917.
112. Roberts RJ, Belfort M, Bestor T, Bhagwat AS, Bickle TA, Bitinaite J, Blumenthal RM, et al. (2003). A nomenclature for restriction enzymes, DNA methyltransferases, homing endonucleases and their genes. *Nucleic Acids Research* 31: 1805-1812.
113. Lohman GJ, Tabor S, Nichols NM (2011). DNA ligases. *Curr Protoc Mol Biol* Chapter 3: Unit3 14.
114. Mandel M, Higa A (1970). Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J Mol Biol* 53: 159-162.
115. Cohen SN, Chang AC, Hsu L (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: Genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 69: 2110-2114.
116. Lederberg J (1956). Bacterial protoplasts induced by penicillin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 42: 574-577.
117. Kieser T, Bibb MJ, Buttner MJ, Chater KF, Hopwood DA (2000). Practical *Streptomyces* genetics. John Innes Foundation: Norwich, England.
118. Jackson DA, Symons RH, Berg P (1972). Biochemical method for inserting new genetic information into DNA of simian virus 40: Circular SV40 DNA molecules containing lambda phage genes and the galactose operon of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 69: 2904-2909.
119. Chang AC, Cohen SN (1974). Genome construction between bacterial species in vitro: Replication and expression of *Staphylococcus* plasmid genes in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 71: 1030-1034.
120. Morrow JF, Cohen SN, Chang AC, Boyer HW, Goodman HM, Helling RB (1974). Replication and transcription of eukaryotic DNA in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 71: 1743-1747.
121. Maxam AM, Gilbert W (1977). A new method for sequencing DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74: 560-564.
122. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74: 5463-5467.
123. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1: 263-273.
124. Zhu H, Zhang H, Xu Y, Lassakova S, Korabecna M, Neuzil P (2020). PCR past, present and future. *Biotechniques* 69: 317-325.
125. Horvath P, Barrangou R (2010). CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. *Science* 327: 167-170.
126. Hale CR, Zhao P, Olson S, Duff MO, Graveley BR, Wells L, Terns RM, Terns MP (2009). RNA-guided RNA cleavage by a CRISPR RNA-Cas protein complex. *Cell* 139: 945-956.

127. Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, Romero DA, Horvath P (2007). CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science* **315**: 1709-1712.
128. Brouns SJ, Jore MM, Lundgren M, Westra ER, Slijkhuis RJ, Snijders AP, Dickman MJ, Makarova KS, Koonin EV, van der Oost J (2008). Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. *Science* **321**: 960-964.
129. Garneau JE, Dupuis ME, Villion M, Romero DA, Barrangou R, Boyaval P, Fremaux C, Horvath P, Magadan AH, Moineau S (2010). The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature* **468**: 67-71.
130. Bolotin A, Quinquis B, Sorokin A, Ehrlich SD (2005). Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology (Reading)* **151**: 2551-2561.
131. Mojica FJM, Díez-Villasenor C, García-Martínez J, Almendros C (2009). Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system. *Microbiology (Reading)* **155**: 733-740.
132. Sashital DG, Wiedenheft B, Doudna JA (2012). Mechanism of foreign DNA selection in a bacterial adaptive immune system. *Mol Cell* **46**: 606-615.
133. Campbell NA, Urry LA, Cain ML, Wassermann SA, Minorsky PV, Reece JB (2019). Biotechnologie. In *Campbell biologie, german edition*, 11 ed.; Paululat, A, Heinisch, JJ, Eds. Pearson Deutschland GmbH: Halbermoss, Germany.
134. Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M, Nakata A (1987). Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J Bacteriol* **169**: 5429-5433.
135. Nakata A, Amemura M, Makino K (1989). Unusual nucleotide arrangement with repeated sequences in the *Escherichia coli* K-12 chromosome. *J Bacteriol* **171**: 3553-3556.
136. Jansen R, Embden JD, Gaastera W, Schouls LM (2002). Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Mol Microbiol* **43**: 1565-1575.
137. Mojica FJ, Díez-Villasenor C, Soria E, Juez G (2000). Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria. *Mol Microbiol* **36**: 244-246.
138. Mojica FJ, Díez-Villasenor C, García-Martínez J, Soria E (2005). Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *J Mol Evol* **60**: 174-182.
139. Pourcel C, Salvignol G, Vergnaud G (2005). CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies. *Microbiology (Reading)* **151**: 653-663.
140. Gasiunas G, Barrangou R, Horvath P, Siksnys V (2012). Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**: E2579-2586.
141. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* **337**: 816-821.
142. Hsu PD, Lander ES, Zhang F (2014). Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell* **157**: 1262-1278.
143. Shmakov S, Smargon A, Scott D, Cox D, Pyzocha N, Yan W, Abudayyeh OO, Gootenberg JS, Makarova KS, Wolf YI, Severinov K, Zhang F, Koonin EV (2017). Diversity and evolution of class 2 CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol* **15**: 169-182.
144. Koonin EV, Makarova KS, Zhang F (2017). Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems. *Curr Opin Microbiol* **37**: 67-78.

145. Makarova KS, Haft DH, Barrangou R, Brouns SJ, Charpentier E, Horvath P, Moineau S, Mojica FJ, Wolf YI, Yakunin AF, van der Oost J, Koonin EV (2011). Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol* **9**: 467-477.
146. Doudna JA (2020). The promise and challenge of therapeutic genome editing. *Nature* **578**: 229-236.
147. Doudna JA, Charpentier E (2014). Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* **346**: 1258096.
148. Wang JY, Doudna JA (2023). CRISPR technology: A decade of genome editing is only the beginning. *Science* **379**: eadd8643.
149. Wong C (2023). UK first to approve crispr treatment for diseases: What you need to know. *Nature* **623**: 676-677.
150. Chater KF, Biro S, Lee KJ, Palmer T, Schrempf H (2010). The complex extracellular biology of *Streptomyces*. *FEMS Microbiol Rev* **34**: 171-198.
151. Flardh K, Buttner MJ (2009). *Streptomyces* morphogenetics: Dissecting differentiation in a filamentous bacterium. *Nat Rev Microbiol* **7**: 36-49.
152. Hopwood DA (2007). *Streptomyces* in nature and medicine. Oxford University Press: Oxford.
153. Baltz RH (2016). Genetic manipulation of secondary metabolite biosynthesis for improved production in *Streptomyces* and other actinomycetes. *J Ind Microbiol Biotechnol* **43**: 343-370.
154. Lasic DD, Papahadjopoulos D (1995). Liposomes revisited. *Science* **267**: 1275-1276.
155. Rodicio MR, Chater KF (1982). Small DNA-free liposomes stimulate transfection of *Streptomyces* protoplasts. *J Bacteriol* **151**: 1078-1085.
156. Chater KF, King AA, Rodicio MR, Bruton CJ, Piret JM, Smith CP, Foster SG (1985). The cloning and analysis of *Streptomyces* DNA in fc31 derived vectors.
157. Rodicio MR, Bruton CJ, Chater KF (1985). New derivatives of the *Streptomyces* temperate phage phi C31 useful for the cloning and functional analysis of *Streptomyces* DNA. *Gene* **34**: 283-292.
158. Arrand JR, Myers PA, Roberts RJ (1978). A new restriction endonuclease from *Streptomyces albus* G. *J Mol Biol* **118**: 127-135.
159. Chater KF, Wilde LC (1980). *Streptomyces albus* G mutants defective in the SalGI restriction-modification system. *J Gen Microbiol* **116**: 323-334.
160. Rodicio MR, Chater KF (1988). Cloning and expression of the Sall restriction-modification genes of *Streptomyces albus* G. *Molec. Gen. Genet.* **213**: 346-353.
161. Rodicio MR, Quinton-Jager T, Moran LS, Slatko BE, Wilson GG (1994). Organization and sequence of the Sall restriction-modification system. *Gene* **151**: 167-172.
162. Rodicio MR, Álvarez MA, Chater KF (1991). Isolation and genetic structure of IS112, an insertion sequence responsible for the inactivation of the Sall restriction-modification system of *Streptomyces albus* G. *Mol Gen Genet* **225**: 142-147.
163. Cauich Sánchez PI (2002). Caracterización del sistema Sall de una mutante de *Streptomyces albus* G termosensible. PhD Thesis, Instituto Politécnico Nacional, México.
164. Álvarez MA, Chater KF, Rodicio MR (1993). Complex transcription of an operon encoding the Sall restriction-modification system of *Streptomyces albus* G. *Mol Microbiol* **8**: 243-252.
165. Álvarez MA, Gómez A, Gómez P, Brooks JE, Rodicio MR (1996). Comparative analysis of expression of the Sall restriction-modification system in *Escherichia coli* and *Streptomyces*. *Mol Gen Genet* **253**: 74-80.

166. Dáaz LA, Hardisson C, Rodicio MR (1989). Isolation and characterization of actinophages infecting *Streptomyces* species and their interaction with host restriction-modification systems. *Journal of General Microbiology* 135: 1847-1856.
167. Díaz LA, Hardisson C, Rodicio MR (1991). Characterization of the temperate actinophage-phi-A7 DNA and its deletion derivatives. *Journal of General Microbiology* 137: 293-298.
168. Gómez P, Ribas-Aparicio RM, Peláez AI, Gómez A, Rodicio MR (1997). Isolation and nucleotide sequence of the gene encoding the XamI DNA methyltransferase of *Xanthomonas campestris* pv *amaranthicola*. *Bba-Gene Struct Expr* 1351: 261-266.
169. Peláez AI, Ribas-Aparicio RM, Gómez A, Rodicio MR (1998). Establishment of a hybrid Sall-HgiDII type II restriction-modification system. *Biol Chem* 379: 583-584.
170. Peláez AI, Ribas-Aparicio RM, Gómez A, Rodicio MR (2001). Structural and functional characterization of the *recR* gene of *Streptomyces*. *Mol Genet Genomics* 265: 663-672.
171. Blanco G, Rodicio MR, Puglia AM, Méndez C, Thompson CJ, Salas JA (1994). Synthesis of ribosomal proteins during growth of *Streptomyces coelicolor*. *Mol Microbiol* 12: 375-385.
172. Blanco G, Sánchez C, Rodicio MR, Méndez C, Salas JA (2001). Identification of a growth phase-dependent promoter in the *rpjL* operon of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Biochim Biophys Acta* 1517: 243-249.
173. Rice LB (2008). Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: No ESKAPE. *J Infect Dis* 197: 1079-1081.
174. Parry CM, Threlfall EJ (2008). Antimicrobial resistance in typhoidal and nontyphoidal salmonellae. *Curr Opin Infect Dis* 21: 531-538.
175. WHO (2018). Critically important antimicrobials for human medicine. 6th revision. <https://www.WHO.Int/publications/i/item/9789241515528>.
176. Gulig PA (1990). Virulence plasmids of *Salmonella typhimurium* and other salmonellae. *Microb Pathog* 8: 3-11.
177. Fierer J (2001). Extra-intestinal *Salmonella* infections: The significance of *spv* genes. *Clin Infect Dis* 32: 519-520.
178. Rodicio MR, Herrero A, Rodríguez I, García P, Montero I, Beutlich J, Rodicio R, Guerra B, Mendoza MC (2011). Acquisition of antimicrobial resistance determinants by virulence plasmids specific for nontyphoid serovars of *Salmonella enterica*. *Reviews in Medical Microbiology* 22: 55-65.
179. Guerra B, Soto S, Helmuth R, Mendoza MC (2002). Characterization of a self-transferable plasmid from *Salmonella enterica* serotype Typhimurium clinical isolates carrying two integron-borne gene cassettes together with virulence and drug resistance genes. *Antimicrob Agents Chemother* 46: 2977-2981.
180. Herrero A, Rodicio MR, Echeita MA, Mendoza MC (2008). *Salmonella enterica* serotype Typhimurium carrying hybrid virulence-resistance plasmids (pUO-StVR): A new multidrug-resistant group endemic in Spain. *Int J Med Microbiol* 298: 253-261.
181. Herrero A, Rodicio MR, González-Hevia MA, Mendoza MC (2006). Molecular epidemiology of emergent multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium strains carrying the virulence resistance plasmid pUO-StVR2. *J Antimicrob Chemother* 57: 39-45.
182. Antunes P, Machado J, Sousa JC, Peixe L (2004). Dissemination amongst humans and food products of animal origin of a *Salmonella typhimurium* clone expressing an integron-borne OXA-30 beta-lactamase. *J Antimicrob Chemother* 54: 429-434.
183. Beutlich J, Rodicio MR, Mendoza MC, García P, Kirchner M, Luzzi I, Mevius D, Threlfall J, Helmuth R, Guerra B; Med-Vet-Net WP21 Project Group (2013). *Salmonella enterica* serovar Typhimurium virulence-resistance plasmids derived from the pSLT carrying

- nonconventional class 1 integrons with *dfrA12* gene in their variable region and *sul3* in the 3' conserved segment. *Microb Drug Resist* 19: 437-445.
184. Herrero A, Mendoza MC, Threlfall EJ, Rodicio MR (2009). Detection of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium with pUO-StVR2-like virulence-resistance hybrid plasmids in the United Kingdom. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 28: 1087-1093.
 185. Montero I, Herrero-Fresno A, Rodicio R, Rodicio MR (2013). Efficient mobilization of a resistance derivative of pSLT, the virulence plasmid specific of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, by an IncI1 plasmid. *Plasmid* 70: 104-109.
 186. Herrero A, Mendoza MC, Rodicio R, Rodicio MR (2008). Characterization of pUO-StVR2, a virulence-resistance plasmid evolved from the pSLT virulence plasmid of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Antimicrob Agents Chemother* 52: 4514-4517.
 187. Andrews SC, Robinson AK, Rodríguez-Quinones F (2003). Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol Rev* 27: 215-237.
 188. García V, Herrero-Fresno A, Rodicio R, Felipe-López A, Montero I, Olsen JE, Hensel M, Rodicio MR (2020). A plasmid-encoded FetMP-Fls iron uptake system confers selective advantages to *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in growth under iron-restricted conditions and for infection of mammalian host cells. *Microorganisms* 8: 630.
 189. García V, García P, Rodríguez I, Rodicio R, Rodicio MR (2016). The role of IS26 in evolution of a derivative of the virulence plasmid of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis which confers multiple drug resistance. *Infect Genet Evol* 45: 246-249.
 190. Rodríguez I, Guerra B, Mendoza MC, Rodicio MR (2011). pUO-SeVR1 is an emergent virulence-resistance complex plasmid of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *J Antimicrob Chemother* 66: 218-220.
 191. García V, Mandomando I, Ruiz J, Herrera-León S, Alonso PL, Rodicio MR (2018). *Salmonella enterica* serovars typhimurium and enteritidis causing mixed infections in febrile children in Mozambique. *Infect Drug Resist* 11: 195-204.
 192. Rodríguez I, Rodicio MR, Guerra B, Hopkins KL (2012). Potential international spread of multidrug-resistant invasive *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Emerg Infect Dis* 18: 1173-1176.
 193. Gilchrist JJ, MacLennan CA (2019). Invasive nontyphoidal *Salmonella* disease in Africa. *EcoSal Plus* 8: 10.1128/ecosalplus.ESP-0007-2018.
 194. Vázquez X, Fernández J, Alkorta M, de Toro M, Rodicio MR, Rodicio R (2023). Spread of *bla*_{CTX-M-9} and other clinically relevant resistance genes, such as *mcr-9* and *qnrA1*, driven by IncHI2-ST1 plasmids in clinical isolates of monophasic *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ST34. *Antibiotics (Basel)* 12: 547.
 195. Vázquez X, García V, Fernández J, Bances M, de Toro M, Ladero V, Rodicio R, Rodicio MR (2022). Colistin resistance in monophasic isolates of *Salmonella enterica* ST34 collected from meat-derived products in Spain, with or without CMY-2 co-production. *Front Microbiol* 12: 735364.
 196. Vazquez X, Forcelledo L, Balboa-Palomino S, Fernández J, Rodicio MR (2022). Nosocomial pneumonia caused in an immunocompetent patient by the emergent monophasic ST34 variant of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium: Treatment-associated selection of fluoroquinolone and piperacillin/tazobactam resistance. *Antibiotics (Basel)* 11: 303.
 197. de Toro M, Fernández J, García V, Mora A, Blanco J, de la Cruz F, Rodicio MR (2017). Whole genome sequencing, molecular typing and in vivo virulence of OXA-48-producing *Escherichia coli* isolates including ST131 H30-Rx, H22 and H41 subclones. *Sci Rep* 7: 12103.

198. Fernández J, Montero I, Fleites A, Rodicio MR (2014). Cluster of *Escherichia coli* isolates producing a plasmid-mediated OXA-48 beta-lactamase in a Spanish hospital in 2012. *J Clin Microbiol* 52: 3414-3417.
199. Fernández J, Montero I, Martínez O, Fleites A, Poirel L, Nordmann P, Rodicio MR (2015). Dissemination of multiresistant *Enterobacter cloacae* isolates producing OXA-48 and CTX-M-15 in a Spanish hospital. *Int J Antimicrob Agents* 46: 469-474.
200. Lumbreras-Iglesias P, Rodicio MR, Valledor P, Suárez-Zarracina T, Fernández J (2021). High-level carbapenem resistance among OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* with functional OmpK36 alterations: Maintenance of ceftazidime/avibactam susceptibility. *Antibiotics (Basel)* 10: 1174.
201. Fernández J, Poirel L, Rodicio MR, Nordmann P (2016). Concomitant and multiclonal dissemination of OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* in a Spanish hospital. *J Antimicrob Chemother* 71: 1734-1736.
202. Rodríguez-Lucas C, Rodicio MR, Vázquez X, Escudero D, Quindos B, Alaguero M, Fernández J (2021). Extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* carrying *bla*_{OXA-23-like} and *armA* in a hospital after an intervention in the intensive care unit which ended a long-standing endemicity. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 40: 385-389.
203. Fernández J, Cunningham SA, Fernández-Verdugo A, Viña-Soria L, Martín L, Rodicio MR, Escudero D, Vázquez F, Mandrekar JN, Patel R (2017). Evaluation of a real-time pcr assay for rectal screening of OXA-48-producing *Enterobacteriaceae* in a general intensive care unit of an endemic hospital. *Diagn Microb Infect Dis* 88: 252-258.
204. Fernández J, Rodríguez-Lucas C, Fernández-Suárez J, Vázquez F, Rodicio MR (2016). Identification of *Enterobacteriaceae* and detection of carbapenemases from positive blood cultures by combination of MALDI-TOF MS and Carba NP performed after four hour subculture in Mueller Hinton. *J Microbiol Methods* 129: 133-135.
205. Fernández-Caso B, Lumbreras-Iglesias P, Rodicio MR, Fernández J, Rodríguez-Lucas C (2024). Usefulness of inclusion of ertapenem and temocillin screening breakpoints in the eucast rapid antimicrobial susceptibility testing (RAST) for rapid detection of OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* directly from positive blood cultures. *J Antimicrob Chemother* 79: 462-466.
206. Rodríguez-Lucas C, Rodicio MR, Costales I, Boga JA, Vazquez F, Fernández J (2018). Evaluation of sepsis flow chip for identification of gram-negative bacilli and detection of antimicrobial resistance genes directly from positive blood cultures. *Diagn Microbiol Infect Dis* 91: 205-209.
207. Rodríguez-Lucas C, Rodicio MR, Rosete Y, Fernández J (2020). Prospective evaluation of an easy and reliable work flow for the screening of OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* in endemic settings. *J Hosp Infect* 105: 659-662.
208. Lumbreras-Iglesias P, Rodrigo-Arrazola E, López-Amor L, Fernández-Suárez J, Rodicio MR, Fernández J (2023). Clinical and microbiological risk factors for 30-day mortality of bloodstream infections caused by OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Pathogens* 13: 11.
209. FAO, PNUMA, OMS, OMSA (2023). Plan de acción conjunto "una sola salud" (2022-2026). Trabajar juntos por la salud de los seres humanos, los animales, las plantas y el medio ambiente. Roma.
210. Argudín MA, Mendoza MC, Méndez FJ, Martín MC, Guerra B, Rodicio MR (2009). Clonal complexes and diversity of exotoxin gene profiles in methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* isolates from patients in a Spanish hospital. *J Clin Microbiol* 47: 2097-2105.
211. Argudín MA, Mendoza MC, Vazquez F, Guerra B, Rodicio MR (2011). Molecular typing of *Staphylococcus aureus* bloodstream isolates from geriatric patients attending a long-term care Spanish hospital. *J Med Microbiol* 60: 172-179.

212. Argudín MA, Mendoza MC, Vazquez F, Rodicio MR (2011). Exotoxin gene backgrounds in bloodstream and wound *Staphylococcus aureus* isolates from geriatric patients attending a long-term care Spanish hospital. *J Med Microbiol* **60**: 1605-1612.
213. Argudín MA, Argumosa V, Mendoza MC, Guerra B, Rodicio MR (2013). Population structure and exotoxin gene content of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* from Spanish healthy carriers. *Microb Pathog* **54**: 26-33.
214. Argudín MA, Mendoza MC, González-Hevia MA, Bances M, Guerra B, Rodicio MR (2012). Genotypes, exotoxin gene content, and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* strains recovered from foods and food handlers. *Appl Environ Microbiol* **78**: 2930-2935.
215. Argudín MA, Mendoza MC, Martín MC, Rodicio MR (2014). Molecular basis of antimicrobial drug resistance in *Staphylococcus aureus* isolates recovered from young healthy carriers in Spain. *Microb Pathog* **74**: 8-14.
216. Argudín MA (2011). Epidemiología molecular y bases genéticas de la resistencia y virulencia de *Staphylococcus aureus* de diferente origen. PhD Thesis, Universidad de Oviedo,
217. Argudin MA, Mendoza MC, Rodicio MR (2010). Food poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins. *Toxins (Basel)* **2**: 1751-1773.
218. Dortet L, Glaser P, Kassis-Chikhani N, Girlich D, Ichai P, Boudon M, Samuel D, Creton E, Imanci D, Bonnin R, Fortineau N, Naas T (2018). Long-lasting successful dissemination of resistance to oxazolidinones in MDR *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates in a tertiary care hospital in France. *J Antimicrob Chemother* **73**: 41-51.
219. Rodríguez-Lucas C, Rodicio MR, Cámara J, Domínguez MA, Alaguero M, Fernández J (2020). Long-term endemic situation caused by a linezolid- and methicillin-resistant clone of *Staphylococcus epidermidis* in a tertiary hospital. *J Hosp Infect* **105**: 64-69.
220. Rodríguez-Lucas C, Fernández J, Boga JA, López-Amor L, Forcelledo L, Lázaro-López E, Rodicio MR (2018). Nosocomial ventriculitis caused by a methicillin- and linezolid-resistant clone of *Staphylococcus epidermidis* in neurosurgical patients. *J Hosp Infect* **100**: 406-410.
221. González AJ, Fernández AM, San José M, González-Varela G, Rodicio MR (2012). A *Pseudomonas viridiflava*-related bacterium causes a dark-reddish spot disease in *Glycine max*. *Appl Environ Microb* **78**: 3756-3758.
222. González AJ, Rodicio MR, Mendoza MC (2003). Identification of an emergent and atypical *Pseudomonas viridiflava* lineage causing bacteriosis in plants of agronomic importance in a Spanish region. *Appl Environ Microbiol* **69**: 2936-2941.
223. San José M, Rodicio MR, Argudín MA, Mendoza MC, González AJ (2010). Regional variations in the population structure of *Pseudomonas syringae* pathovar phaseolicola from Spain are revealed by typing with Pmel pulsed-field gel electrophoresis, plasmid profiling and virulence gene complement. *Microbiology (Reading)* **156**: 1795-1804.
224. González AJ, Cleenwerck I, De Vos P, Fernández-Sanz AM (2013). *Pseudomonas asturiensis* sp nov., isolated from soybean and weeds. *Syst Appl Microbiol* **36**: 320-324.
225. Bances M (2011). Brotes de salmonelosis en el Principado de Asturias (2002-2009): Caracterización y adscripción a grupos genómicos de cepas implicadas. PhD Thesis, Universidad de Oviedo, Spain.

11. Agradecimientos

Mis primeras palabras de agradecimiento van dirigidas a Mario Díaz, Presidente de la Academia de Ciencias e Ingeniería de Asturias, y demás compañeros de la AACI. Gracias por vuestra iniciativa y entusiasmo al emprender esta andadura cuya principal finalidad es acercar la ciencia y la ingeniería a la sociedad asturiana. Soy consciente del honor que se me otorga y del compromiso que adquiero con vosotros y con la Academia. Espero estar a la altura del desafío y responder a la confianza que en mí depositáis.

En este momento tan especial de mi vida profesional, también quisiera expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas que a lo largo de los años compartieron mi andadura, tanto en docencia como en investigación. Es imposible mencionarlos a todos pero todos contáis con mi reconocimiento.

Sin embargo, no puedo dejar de destacar a Carlos Hardisson y Keith Chater, que marcaron los inicios de mi trayectoria científica, y muy especialmente a Carmen Mendoza por promover mi incorporación a su línea de investigación sobre "Bacterias patógenas de interés clínico y agroalimentario" cuando ya estaba en plena producción. Gracias por elevar a otro nivel los conceptos de compañerismo y amistad y por compartir conmigo tu creatividad artística.

Gracias también a José Antonio Salas por su desinteresado apoyo en la etapa de *Streptomyces*, cuando él vivía en mañana y yo estaba aún en ayer, coincidiendo en el presente y en el despacho. Mi más sincero agradecimiento a Pepe Guijarro, buen compañero y mejor persona, por evitar que en momentos difíciles abandonara la investigación, no por voluntad sino por necesidad. Gracias Pepe.

Especial mención merecen todas las personas que trabajaron en investigación bajo mi supervisión y aquellas con las cuales tuve la suerte de colaborar. Espero haber dejado constancia en este discurso de lo mucho que os debo.

A mis profesores, por sentar las bases de mis conocimientos y muy especialmente a mis alumnos de Licenciatura, Grado, Máster y programas de Doctorado. El filósofo estoico Séneca (4 aC-65 dC) dijo: "*Mientras enseñamos, aprendemos*", destacando la relación simbiótica entre impartir conocimiento y crecimiento personal. Estoy totalmente de acuerdo.

Y como no, a mi familia, por todo lo que han hecho y seguirán haciendo por mí.

A mis padres, Celso y Celina, por su generosidad y entrega.

A Celso, inagotable lector sobre todo de filosofía, ensayo, literatura e historia, sin cohibirse ante la relatividad de Einstein. Gracias por inculcarnos la importancia del saber, enseñarnos que "la alegría se cultiva" y también por el inquebrantable optimismo que te hacía ver la botella llena entera.

"El que lee mucho y anda mucho, ve mucho y sabe mucho."
Don Quijote de la Mancha. Miguel de Cervantes (1547-1616)



A Celina, trabajadora infatigable y resistente al desánimo. Gracias por infundir sentido común a toda la familia, obligándonos a poner los pies en la tierra, y por tener (casi) siempre razón, haciendo buena la frase *"ya te lo decía yo"*. Gracias por ser la mejor cocinera del mundo y porque:

"Si los hombres hiciesen ganchillo y bordados, hoy sus obras estarían en importantes museos."

Frase modificada de Mariasun Landa, escritora vasca (1949-)

A los Rodicio (Rodicio) por mantener el acervo genético y a los nuevos por introducir variabilidad. Muy especialmente a Celina, Nelson, Ángeles, Rosaura, Jürgen, Julián, Marta, Cristina, Javi, Daniel, Tania y desde luego a los peques: Alex, Alicia, Pablo y Sofía.

Al resto de mi familia y a mis amistades.

Y finalmente a todos los que tuvisteis el interés de leer este discurso.