

de dicho tratado internacional (118 países a 6 de marzo de 2003). Una patente cualquiera se puede proteger en España por cualquiera de estas tres vías.

#### ¿Y la situación real?

A escala europea, España ocupa un lugar muy discreto en lo referente al número de solicitudes de patentes europeas, aunque exhibe un crecimiento positivo (puestos 11.<sup>º</sup> y 4.<sup>º</sup>, respectivamente, en «la Europa de los 15», datos de 2001, Informe COTEC 2003). A escala nacional, los datos publicados por la OEPM referidos al año 2003 indican una tendencia ascendente, tanto en el número de patentes solicitadas como concedidas, así como en el porcentaje de solicitudes finalmente concedidas [OEPM, Avance Estadísticas de Propiedad Industrial, 2003]. Asimismo, los datos recogidos en la Memoria del III Plan Andaluz de Investigación [III PAI, 2002] indican tendencias positivas en el número de solicitudes de patentes. En este contexto, Andalucía se sitúa en cuarta posición en el número total de solicitudes de patentes, aunque desciende hasta el puesto doce cuando ese número es referido al número de habitantes. Estos datos son más o menos coincidentes con los publicados en el Índice EOI 2004.

Sin embargo, el número de solicitudes de patentes gestionadas por las Oficinas de Transferencia de Resultados de Investigación (OTRI) agrupadas en la Red OTRI de Universidades refleja que la contribución de las universidades en este sentido es, aunque positiva,

ciertamente baja [Red OTRI de Universidades, Informe de Actividades 2003]. Así, las Universidades españolas, a través de sus OTRI, han gestionado aproximadamente el 10 % de las solicitudes tramitadas en España por vía nacional en los últimos años, cuando son responsables de más del 30 % de la investigación que se realiza en el país [Fundación CYD, Informe sobre la Contribución de las Universidades Españolas al Desarrollo, 2004]. En el contexto de la Red OTRI de Universidades, el número de solicitudes tramitadas por las OTRI andaluzas corresponde a aproximadamente un 16 % del total en el período 1999 – 2003, ocupando la Universidad de Málaga el segundo puesto a nivel andaluz en dicho período.

Las patentes constituyen, pues, un indicador de la cantidad y de la calidad de los resultados de investigación, así como del volumen de transferencia de los mismos a las empresas. Tanto en el III PAI (2000 – 2003) como en los últimos Planes Nacionales de I + D + I (2000 – 2003 y 2004 – 2007) se contemplan acciones para impulsar y fortalecer la generación de patentes y su transferencia o aplicación. Es, por tanto, de gran importancia diseñar y aplicar estrategias que posibiliten un mayor desarrollo en este ámbito. En este sentido, la Universidad de Málaga ha presentado recientemente el premio de patentes «Inventum», cuya finalidad es promover la generación de patentes por parte de los investigadores y apoyar económicamente la extensión internacional de las mismas.

## LA EVOLUCIÓN DE LOS MICROORGANISMOS PATÓGENOS. «¿APRENDIENDO A SER MALOS?»

Antonio de Vicente

*Profesor Titular del Departamento de Microbiología. Universidad de Málaga*

Cómo surge un microorganismo patógeno, cómo se hace patógeno o de dónde viene, son cuestiones a discutir aquí, porque parece lógico asumir que el hábitat fue antes que el microorganismo adaptado a él; así que si antes fue el huésped que el patógeno, ¿cómo se da el paso hacia hacerse patógeno? ¿Era patógeno de otro huésped y se adapta a un nuevo huésped?, o ¿era comensal sobre ese huésped y se hace patógeno?, hay múltiples ejemplos de ambas opciones, de virus que superan una determinada barrera específica de huésped, así como de cepas patógenas de especies habitualmente comensales, como las cepas patógenas de *Escherichia coli*. ¿Dónde estaba *E. coli* o su antecesor, antes de que existiera su hábitat natural, el tubo digestivo humano? ¿Cómo algunas cepas de *E. coli* se han hecho enteroinvasoras o uropatógenas? Intentaremos dar algo de luz a estas preguntas y, sobre todo, dejar abiertas a la reflexión y al conocimiento de nuevos datos otras. Una matización inicial: las enfermedades infecciosas, resultado

de la interacción de un microorganismo patógeno con el organismo huésped, evolucionan como resultado de varios elementos, la evolución del huésped y la del patógeno, la interacción entre ambos y una serie de factores que inciden y modulan dicha interacción; aunque en estas líneas trataremos de centrarnos en la evolución de un solo elemento, el microorganismo patógeno. Ya Darwin se interesó en la transmisión de las enfermedades infecciosas, como la escarlatina, pero enfocó esta cuestión desde el punto de vista de que las enfermedades infecciosas funcionan como un agente selectivo en la evolución del huésped, y no desde la evolución del propio microparásito. Como ilustraba Haldane «es más fácil para un ratón tener un conjunto de genes para resistir a *Salmonella typhimurium*, que para resistir a los gatos», aunque yo a veces no veo esto tan claro.

Un aspecto crucial en este tema es lo que llamamos «coevolución» huésped-parásito, es decir, la evolución

de ambos elementos de la interacción apoyada en los mecanismos derivados de la influencia mutua entre ambos. Relacionado con este aspecto, quizás habría que fijarse en ejemplos muy conocidos de simbiosis microbio-huésped, donde ambos elementos se han adaptado a la vida común y «ya no pueden vivir el uno sin el otro» tras un prolongado proceso de coevolución que ha llevado a que incluso comparten mecanismos bioquímicos y moléculas. Son casos espectaculares la microbiota del rumen o del tubo gastrointestinal de las termitas, o los nódulos fijadores de nitrógeno de *Rhizobium-leguminosas* que, no olvidemos, comienzan a formarse tras un proceso de infección, aunque ésta no desencadena un proceso de enfermedad en el huésped, sino todo lo contrario, formas de vida imposibles sin estas simbiosis. Pero estos temas de «buenos» necesitarían tratarlos aparte, y hoy vamos a hablar de «malos». Desde el punto de vista de la evolución del huésped y del patógeno en base a la interacción entre ambos, resultan muy elegantes y atractivos los trabajos del Prof. Ebert y cols. (Capaul y Ebert, 2003, *Evolution*, 57, 249-260; Decaestecker y cols., 2003, *Evolution*, 57, 784-792), que aportan luz a estos procesos de coevolución, en los que el parásito evoluciona en respuesta al huésped y el huésped en respuesta al patógeno, en un modelo que puede ser observado en directo, ya que realizan una serie de llamativos experimentos empleando diferentes clones de *Daphnia magna* (huésped) y de algunos protozoos y bacterias parásitos de la pulga de agua, que han puesto de manifiesto concluyentemente, entre otras cuestiones, que la interacción con los parásitos es una clara fuente de selección en las poblaciones del huésped, basándose en factores como la susceptibilidad del huésped o la infectividad y virulencia del parásito.

Bien, centrémonos ahora en la evolución de la virulencia del microorganismo patógeno y recordemos que, en términos microbiológicos, la patogenicidad es la capacidad que tiene un microorganismo para producir una enfermedad, mientras que el término virulencia se suele usar para hacer referencia al grado de daño/mortalidad provocado por el patógeno. La virulencia evoluciona en base a los mecanismos de variación genética y selección natural, pero se aceptaba de forma general que esta evolución del microorganismo patógeno viene dirigida fundamentalmente por la interacción con el huésped y la producción de enfermedad (Read, 1994, *Trends in Microbiology*, 2, 73-76). Clásicamente, se viene considerando que la transmisión del patógeno y su virulencia están asociados y esto, en cierto sentido, supone un lastre para la evolución del patógeno, pues inducir la muerte del huésped es costoso para el patógeno; así una baja tasa de reproducción del patógeno afectará poco a la longevidad del huésped (su hábitat), pero implica que se transmitirá poco, mientras que una alta tasa de reproducción (aumento de virulencia) incrementa su transmisión, pero sólo durante el tiempo que el huésped permanece vivo. Sin embargo, este modelo de evolución de la virulencia basado directamente en la interacción

con el huésped se considera cada vez menos general y como un mecanismo muy débil para la rápida selección de cambios significativos en la virulencia. Recientemente, se han propuesto otros modelos de selección de la virulencia en base a cambios del huésped o a la asociación de la virulencia con otras características de la bacteria (Levin y Bull, 1994, *Trends in Microbiology*, 2, 76-81; Ebert y Bull, 2003, *Trends in Microbiology*, 11, 15-20). Así, la selección directa de la virulencia constituye una alternativa que cada vez acumula más pruebas, en base a que la virulencia no suele ser una función única del patógeno, sino que implica muchas propiedades (diferentes factores de virulencia, especificidad por tejidos o genotipos del huésped, etc). Además, tenemos que considerar que la evolución de los patógenos no está, en la mayoría de los casos, basada en la inducción de daño o mortalidad en el huésped (virulencia), sino basada en la selección de otras propiedades más relacionadas con el *fitness* (expectativas de supervivencia) del patógeno, que a veces están directamente relacionadas con la virulencia, pero que en muchos casos esta relación es indirecta, a través de otras propiedades de la bacteria, como la resistencia a los antibióticos, la infectividad, la capacidad de evadir el sistema inmune, la capacidad de supervivencia fuera del huésped, etc.

Otra consideración importante es que la filogenia, en el caso de las bacterias, ya no es un árbol, el árbol universal de la vida está seriamente cuestionado, y es que este modelo filogenético de árbol resulta demasiado simple para entender el devenir evolutivo de los procariotas. Hay toda una extensa trama de conexiones transversales entre las múltiples «ramas» de bacterias y arqueas, generada sobre todo por la transferencia horizontal de genes, lo que produce un árbol «enmarañado». Es más, en este contexto de «árbol reformado», se cuestiona incluso la existencia de una sola raíz o ancestro común universal (Doolittle, 2000, *Investigación y Ciencia*, Abril, 26-32; Bapteste y cols., 2004, *Trends in Microbiology*, 12, 406-411). La teoría general de la evolución adaptativa en bacterias es cuantitativa y cualitativamente distinta a la de eucariotas con reproducción sexual. Así, en la variación genética en bacterias, las tasas de recombinación genética homóloga en el proceso reproductivo son muy bajas, mientras que juega un papel fundamental la transmisión horizontal de genes y elementos genéticos accesorios (plásmidos, transposones, profagos, etc), que permite a las bacterias adquirir y expresar genes de un amplio rango de especies diferentes (Levin y Bergstrom, 2000, *PNAS*, 97, 6981-6985). En lo que respecta a las bacterias patógenas hay múltiples datos que apoyan la idea de que el hacerse patógeno, es sólo cuestión de recibir un determinado elemento genético por transferencia horizontal. Por ejemplo el hecho de que bacterias patógenas de muy distintos tejidos y huéspedes, incluso de animales y de plantas, comparten genes y mecanismos de implicados en la patogenicidad, a pesar de la diversidad taxonómica en algunos casos (Encuentros en la Biología nº13, 1994),

o la existencia de cepas patógenas y no patógenas muy relacionadas, incluso de la misma especie y que se diferencian sólo en la presencia/ausencia de algunos genes directamente relacionados con la patogenicidad.

Un punto de vista fundamental en este tema es el que aporta el descubrimiento de las denominadas islas genómicas (GI), y, en el caso de que porten genes implicados en la virulencia, islas de patogenicidad (PAI). Las GI son elementos genéticos móviles, relativamente grandes ( $> 10$  kb) que se integran en el cromosoma o en plásmidos asociados a secuencias de tRNA. Se identifican, además, por presentar secuencias repetitivas flanqueantes, diferente contenido en G + C y de uso de codones; codifican diferentes funciones, como la resistencia a antibióticos, funciones relacionadas con fitness, o factores de virulencia, y entonces se denominan PAI, por asociarse con microorganismos patógenos y contribuir a introducir cambios rápidos en el potencial de virulencia. La asociación de genes relacionados con la patogenicidad a elementos móviles del genoma como plásmidos o PAI, hace que el papel de la transmisión horizontal —intercepas o interespecífica— de genes de virulencia sea un hecho bastante frecuente en la naturaleza, con el potencial evolutivo añadido que esto implica respecto a que la transmisión fuera exclusivamente vertical. Los avances genómicos están poniendo de manifiesto cómo ciertas incorporaciones de fragmentos relativamente pequeños al genoma implican cambios importantes en las formas de vida bacteriana y en las interacciones bacteria-huésped (simbiosis, comensalismo, patogenicidad), y son muchos los datos que apoyan la importancia de la transmisión horizontal en la evolución de los microorganismos patógenos.

A modo de ejemplo, la información obtenida desde la secuenciación del genoma de distintas cepas de *E. coli* y otras enterobacterias con diferentes hábitat y tipos de interacción bacteria-huésped, ha permitido obtener mucha información sobre ¿en qué se diferencian? y ¿qué tienen en común? Así, las enterobacterias comparten una buena parte de su genoma, pero su adaptación-relación con muy diferentes ambientes y huéspedes es muy diversa: comensales en intestinales tubo digestivo de humanos y otros mamíferos (*E. coli*, *Enterobacter cloacae*), simbiontes con poiquilotermos e invertebrados (*Buchnera*, *Blochmania*, *Photorhabdus*), microbiota de la rizosfera (*Klebsiella pneumoniae*), patógenos de humanos y mamíferos mediante infecciones intestinales (*Salmonella enterica*, *Yersinia enterocolitica*) o extraintestinales (*Yersinia pestis*, *E. coli* uropatogénicos) o patógenos de plantas (*Erwinia carotovora*). El análisis del genoma de la cepa 536 de *E. coli*, uropatogénica, pone de manifiesto la presencia de varias PAI, entre ellas la PAI IV, que incluye una serie de factores de virulencia, como sideróforos, hemolisina, fimbrias y resistencia al suero. Mientras que en el genoma de la cepa K-12 de *E. coli*, comensal en el intestino y habitual en el laboratorio, no se ha detectado ninguna PAI

(Dobrindt y cols., 2002, *J. Bacteriology*, 70, 6365-6372). Pues bien, en la cepa Nissle 1917 de *E. coli*, comensal y no patógena, pero buena colonizadora y empleada como probiótico en medicina, se han descrito cuatro GI, que contienen muchas propiedades relacionadas con el fitness y una de ellas, la GI IV, es prácticamente idéntica a la PAI de *E. coli* 536 y, por tanto, contiene genes relacionados con la virulencia y colonización (sideróforos, fimbrias, etc) (Grozdanov y cols., 2004, *J. Bacteriology*, 186, 5432-5441). Asimismo, empleando un Patho-Array basado en 456 ORF, de distintas PAI, se ha localizado la presencia de la PAI IV en diferentes cepas patógenas de *E.coli*, *Yersinia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, y... «no patógenas comensales» de *E.coli*, *Klebsiella*, *Photorabdus* (Dobrindt y cols, 2003, *J. Bacteriology*, 185, 1831-1840), ¿por qué éstas no se comportan como patógenas? Posiblemente les faltan algunos elementos más —¿otras PAI?— pero, de cualquier forma, al menos están contribuyendo al mantenimiento en las poblaciones bacterianas de estas PAI y a su difusión a las cepas de otros hábitats y huéspedes (Dobrindt y cols, 2004, *Nature Rev. Microbiology*, 2, 414-424). Estos datos nos deben llevar a ser muy cautos, por ejemplo, con el empleo de microorganismos probióticos, en general comensales no patógenos y buenos colonizadores, pero que pueden recibir o transferir elementos genéticos indispensables para la patogenicidad y «hacerse patógenos» o «hacer a otros». Cuidado, que por lo que parece «hacerse malo» no es tan difícil, «si ya tienen la pistola, sólo tienen que recibir las balas», o viceversa. A veces, podría pensarse que sería más seguro usar, por ejemplo como probiótico, un OMG cuyo genoma y sus potencialidades se conocen íntegramente, a un aislado natural del que sabemos poco o nada ¿o no?

Por si fuera poco, la «promiscuidad genética» bacteriana aumenta el potencial evolutivo de los microorganismos patógenos mediante la transferencia horizontal de genes. Este potencial evolutivo se está viendo favorecido y acelerado fuertemente en los últimos años por la actividad humana, ilustraremos este aspecto con las cuestiones de gran importancia para la evolución de los microorganismos patógenos y, por ende, de las enfermedades infecciosas.

El uso indiscriminado y excesivo de los antibióticos en la clínica humana y veterinaria, y en otras actividades como la agricultura o la ganadería, es un factor selectivo muy potente, no sólo para seleccionar bacterias resistentes a los antibióticos, sino también en la selección de elementos genéticos que además contienen genes relacionados con la virulencia (Encuentros en la Biología, nº 87, 2003). No olvidemos que, con frecuencia, los genes de resistencia a antibióticos están asociados a plásmidos, GI y otros elementos genéticos móviles, transferibles horizontalmente, y a cuya selección contribuyen. Y que, asimismo, a estos elementos se asocian también factores de virulencia, por lo que también pueden contribuir indirectamente a la selección de la virulencia.

El mal uso de los antibióticos, una vez más, demuestra la gran ignorancia de la humanidad en relación con lo que nos enseña la historia natural.

Un segundo aspecto favorecedor del intercambio genético entre microorganismos asociado a la actividad humana, sería el trasiego de «microbios sin fronteras»; los movimientos poblacionales y las actividades comerciales y turísticas, favorecen en la actualidad un continuo trasiego de personas y mercancías, que facilita la diseminación de microorganismos, incluidos los patógenos y sus vectores, por todo el planeta.

A modo de resumen, hacer referencia a un sugerente artículo del Dr. Baquero (Baquero, 2004, *Nature Rev. Microbiology*, 2, 510-518), donde propone que, para entender la evolución de las bacterias patógenas en cuanto a la adquisición de genes de virulencia o de resistencia, debemos considerar este proceso como el resultado de la incorporación de nuevas «piezas» mediante procesos de «ingeniería evolutiva», es decir, mediante la generación de elementos genéticos nuevos, que se someten a los procesos adaptativos al instante. Estos elementos son el resultado de la combinación de tres tipos de piezas: operativas (genes resistencia o virulencia), translocativas

(secuencias inserción, recombinasas, etc) y dispersivas (plásmidos, GI, etc). Esta ganancia de piezas adicionales y los procesos selectivos aumentan las posibles interacciones futuras y, por tanto, llevan hacia un cada vez mayor rango de posibilidades adaptativas de los nuevos patrones generados, en lo que se ha denominado «capitalismo genético». Terminaré con dos frases para la reflexión de la conferencia de clausura del Prof. J. Davies en un simposio: «Los microbios siempre tienen la última palabra» (L. Pasteur), y «No siempre son las especies más fuertes, ni las más inteligentes, las que sobreviven, sino aquellas que mejor responden a los cambios» (C. Darwin). Por tanto, en la lucha contra las enfermedades infecciosas, como en otras tantas cosas, aprendamos de la historia natural, seamos menos pretenciosos y tratemos de adaptarnos mejor a los cambios, en lugar de creernos los matones del barrio y que acabaremos con los microorganismos patógenos porque somos fuertes y listos, e intentemos buscar un equilibrio para seguir aquí: las bacterias ya llevan aquí demasiado tiempo como para que unos listillos recién llegados las eliminen. Sí, la viruela humana se ha erradicado, pero, ¿y los brotes que se están dando de la viruela del mono en humanos ...?

## BIOLOGÍA SINTÉTICA: UN NUEVO DESAFÍO

Enrique Viguera Mínguez

*Profesor Titular de Genética. Área de Genética. Facultad de Ciencias. Universidad de Málaga.*

Gran parte de los avances científicos van siempre ligados al desarrollo de una nueva técnica o metodología. Así, la técnica de terminación prematura de la síntesis enzimática del DNA mediante el uso de análogos de nucleótidos —método de Sanger— posibilitó la secuenciación del DNA y, consecuentemente, la lectura del mensaje genético. La purificación de DNA-polimerasas de organismos termófilos y su utilización en la amplificación de ácidos nucleicos (PCR) ha supuesto, además de una de las patentes más lucrativas de la historia de la Biotecnología, una técnica imprescindible en toda investigación biomédica. Por otro lado, el descubrimiento de los sistemas de restricción-modificación del DNA en las bacterias y posteriormente la purificación de las enzimas de restricción bacterianas, junto con otra serie de herramientas moleculares, permitieron editar dicho mensaje, es decir, introducir nuevas palabras, corregir las ya existentes o cambiar el sentido de la frase: había nacido la Ingeniería Genética. Cabe destacar entre sus primeros logros la producción de la insulina o la hormona de crecimiento humanas a partir de cepas de la bacteria *Escherichia coli* recombinante, sistemas que sustituirían a las fuentes alternativas que suponían su extracción a partir de cadáveres o la utilización de proteínas homólogas de otras especies animales.

Las contribuciones de la Ingeniería Genética han

sido enormes: en el campo de la Biología Molecular ha permitido profundizar en los mecanismos moleculares de diferentes procesos biológicos, posibilitando la identificación y caracterización de genes. En el campo de la Biología Celular, el desarrollo de la Ingeniería Genética, junto con procesos de transferencia de DNA, permitió la asignación de función de genes individuales y su localización celular. De esta forma se identificaron, por ejemplo, los primeros oncogenes tras la transferencia de genotecas (colecciones de genes) humanas a células de ratón en cultivo. Podemos concluir que el fruto alcanzado por la genómica hoy día se debe en gran parte al desarrollo de una nueva estrategia de secuenciación consistente en la fragmentación al azar de una genoteca, técnica conocida como shotgun que, junto con el empleo de fluorocromos —nucleótidos marcados con una molécula fluorescente—, ha permitido afrontar la secuenciación de genomas complejos, como el humano. Los retos que se plantean actualmente en este terreno incluyen el análisis de la información genética de organismos a partir de una muestra ambiental —metagenómica— con el objetivo de encontrar genes desconocidos o descubrir nuevas funciones enzimáticas.

El continuo avance de la Ingeniería Genética ha supuesto la emergencia de un nuevo campo: el de la Biología Sintética. En el I Congreso Internacional que sobre