

## BACTERIAS Y VIRUS ¿CÓMO NOS DEFENDEMOS?

M<sup>a</sup> ANTONIA LIZARBE IRACHETA \*

\* Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales (A. Correspondiente). Departamento de Bioquímica, Facultad de Químicas, Universidad Complutense. lizarbe@bbm1.ucm.es.

Las bacterias y los virus han sido, y en algunos casos continúan siendo, un azote para la humanidad. Sin embargo, desde hace años estamos familiarizados con los términos “antibiótico” y “antiviral”, y con la utilización de algunas de las moléculas de estas familias para combatir las enfermedades producidas por bacterias y por virus. Nuestro organismo debe convivir con las bacterias y los virus y, en el caso de una agresión, protegernos con nuestras defensas naturales, como la piel que supone una barrera para estos agentes invasores, o en otras líneas de defensa con nuestro sistema inmunológico. En el caso de que nuestras defensas no pueden paliar la infección, diversas terapias nos ayudan a ello.

Los microorganismos son agentes etiológicos de numerosas enfermedades; al inicio del siglo XX las enfermedades infecciosas eran una de las causas de muerte más frecuentes y, aunque se ha conseguido un control sobre muchas de ellas con la consiguiente disminución de la mortalidad, aún hoy constituyen una de las principales causas de muerte en países subdesarrollados. Así, el número de personas que mueren por enfermedades microbianas tan extendidas como la malaria, la tuberculosis, el cólera, la gripe, la neumonía, la gastroenteritis, etc., es elevado. Además, los microorganismos todavía constituyen una amenaza grave para enfermos cuyo sistema inmunológico se ha dañado, por las complicaciones resultantes de infecciones oportunistas, o cuando se produce una infección por un patógeno con resistencia múltiple. Todo ello hace que el control de enfermedades infecciosas sea un tema de actualidad, habiéndose alcanzado éxitos tan importantes para la Medicina como la erradicación de la viruela. Con el paso del tiempo varias de las enfermedades causadas por microorganismos patógenos se

han ido controlando gracias a los conocimientos sobre las estructuras celulares y acerca de las bases moleculares de la replicación, transcripción y traducción en células procariotas y eucariotas. Todo ello, en último término, ha posibilitado el desarrollo de los agentes antimicrobianos.

Cabe resaltar que, aunque ciertos microorganismos son los agentes etiológicos responsables de algunas enfermedades, la mayor parte de ellos no son perjudiciales para el hombre. El hombre convive con los microorganismos y se beneficia de ellos. El beneficio de los microorganismos se extiende a numerosos aspectos de la actividad humana. Afectan no solo a la salud humana y su bienestar, sino también participan o desarrollan procesos valiosos para la sociedad en agricultura, alimentación, energía y medio ambiente, biotecnología, etc. Algunas aplicaciones de los microorganismos, actualmente aún bajo estudio, parecen prometedoras. Ciertas bacterias producen antibióticos, como la actinobacteria *Streptomyces griseus* productora de la estreptomicina, otras participan en la elaboración de la mayoría de quesos, como las bacterias *Lactococcus*, *Lactobacillus* o *Streptococcus*, o la en producción del yogur, donde se utiliza *Lactobacillus acidophilus*. Si se considera el microambiente diverso del tracto intestinal, se ha descrito que la comunidad microbiana la constituyen alrededor de 500 especies de bacterias [1]. Entre éstas están los probióticos o microorganismos vivos beneficiosos para el hombre y, aunque se requieren todavía numerosos estudios para poder establecer con firmeza la bondad de los microorganismos probióticos para la salud, hay evidencias de que pueden prevenir enfermedades como la diarrea asociada a los antibióticos, el síndrome de intestino irritable y la enfermedad infla-

matoria intestinal [2]. Un ejemplo es el *Lactobacillus acidophilus* que, además de producir ácido fólico y vitamina B6, degrada nutrientes que otros microorganismos necesitan: produce ácido láctico, peróxido de hidrógeno y otros subproductos que generan un medio hostil para otros organismos indeseables. Otro caso remarcable es la bacteria *Escherichia coli* (*E.coli*), que ha sido y es utilizada como modelo y material biológico en diversas áreas de investigación (entre otras Genética, Biología Molecular, Bioquímica y Biotecnología). Se encuentra en el intestino de los animales y, tanto ella como otras bacterias, actúan como comensales formando parte de la flora intestinal; estas bacterias son necesarias para el funcionamiento correcto de la digestión y ayudan a la absorción de nutrientes.

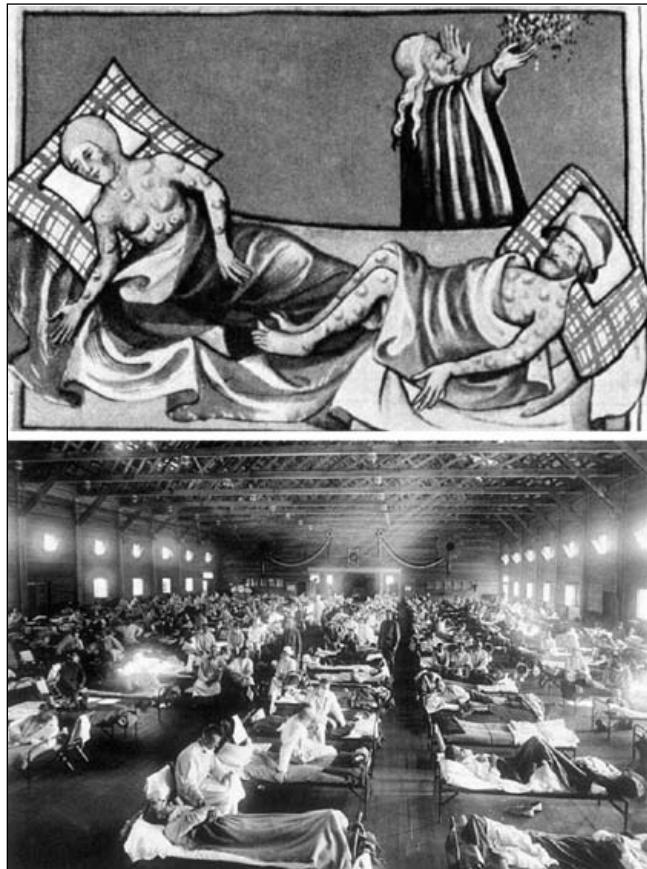
De la cohabitación con bacterias se puede mencionar la diversidad bacteriana que los humanos albergan. Muchos estudios están dirigidos a analizar el tipo de bacterias presentes para ayudar a conocer si los cambios microbianos pueden causar o prevenir una enfermedad. Así, en un trabajo con 51 voluntarios se ha descrito que en la palma de las manos humanas viven más de 150 cepas o filotipos de bacterias, habiéndose encontrado en el total del estudio más de 4.700 cepas bacterianas diferentes. De todas ellas, sólo cinco se encontraban en alguna de las manos de todos los participantes en el estudio; la diversidad era enorme entre las dos manos de un mismo individuo, tan sólo compartiendo de media un 17% de cepas de bacterias [3]. Entre individuos, y dentro de un mismo individuo, hay una variedad a través de los hábitats corporales (la boca, la piel y el intestino) y a través del tiempo [4].

Por otro lado, a los virus no sólo hay que contemplarlos como agentes infecciosos responsables de numerosas enfermedades. Los virus también son considerados herramientas de trabajo ya que pueden ser modificados mediante técnicas de Biología Molecular para potenciales usos terapéuticos, como vectores de terapia génica, nanocontenedores para la liberación dirigida de fármacos, marcadores para diagnóstico, o incluso componentes de nanodispositivos electrónicos. En el caso de la terapia génica, los virus se modifican para emplearse como vectores que permitan introducir material genético exógeno con fines terapéuticos en las células diana. A estos virus se les anula parte de su

genoma incapacitándoles para replicarse en el interior de la célula. Los vectores virales utilizados en terapia génica, algunos de ellos aún en la fase clínica de estudio, son los derivados de retrovirus (p.e. lentivirus) o de virus DNA (p.e. adenovirus o virus herpes simple) [5-7]. Los vectores retrovirales fueron la estrategia pionera en la terapia génica *ex vivo*; en 1994, se publicó el primer ensayo de terapia génica humana *ex vivo*, en el que se trató la hipercolesterolemia familiar empleando retrovirus recombinantes, obteniéndose una corrección estable de la enfermedad [8]. Otro de los tratamientos en desarrollo en la actualidad se basa en la utilización de bacteriófagos o fagos (virus capaces de infectar bacterias) para la profilaxis y tratamiento eficaz de infecciones bacterianas, ya que son activos frente a bacterias pero inactivos frente a células eucariotas [9]. Además, los bacteriófagos podrían ser utilizados como plataformas con péptidos que puedan inducir efectos anticancerígenos y, con la ventaja adicional de que activan al sistema inmunitario en células eucariotas, la terapia fágica podría resultar muy útil para tratar a pacientes con cáncer [10]. En el campo de la diagnosis, se están intentando sustituir técnicas invasivas, como la cirugía, por otras no invasivas que aumenten la calidad de vida del paciente. Por ello, se ha recurrido a la nanotecnología, al diseño de nanopartículas basadas en virus (VNP, *Virus-based nanoparticles*), para el seguimiento por imagen y el tratamiento del cáncer y de enfermedades cardiovasculares [11]. Con estos nanosistemas se intenta repartir de una forma localizada las drogas terapéuticas permitiendo concentraciones locales elevadas en el foco de la enfermedad y minimizando los efectos colaterales adversos [12]. En relación al tratamiento del cáncer también se ha propuesto el empleo de virus oncolíticos, virus capaces de reconocer, infectar y lisar específicamente células tumorales [13, 14]. Se ha llegado incluso a sugerir una mejora de la actividad oncolítica de estos virus introduciendo en el genoma viral genes suicidas.

## LAS PANDEMIAS

Los estudios históricos sobre las epidemias analizan datos demográficos, evaluando la incidencia y mortalidad, la estructura social, el impacto económico y las repercusiones sociológicas y políticas que pudiera ocasionar la epidemia. Un precursor de la



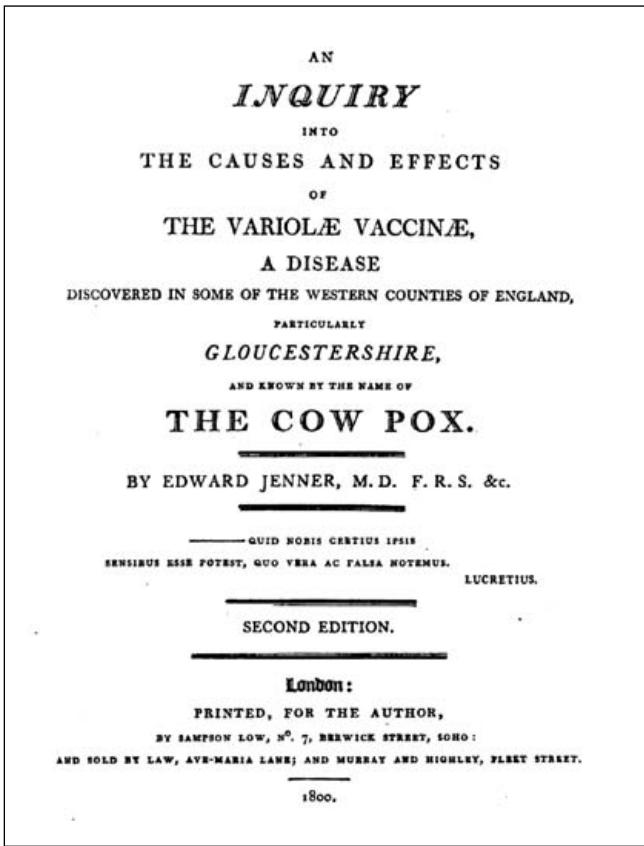
**Figura 1. Pandemias.** Ilustración de la peste en la Biblia de Toggenburg (1411) y fotografía del hospital militar improvisado en Kansas durante el brote de gripe española de 1918-1919 (National Museum of Health and Medicine, Armed Forces Institute of Pathology, Washington, D.C., United States) [21].

Epidemiología es John Snow, que analizó la epidemia de cólera de 1854 en Londres, desarrollando un método para analizar causas y dar solución a las enfermedades transmisibles. La inacabada historia de epidemias infecciosas, que empieza con las que azotaron al mundo antiguo y continúa hasta nuestros días, ha sido objeto de numerosas publicaciones. Los esfuerzos por comprender la naturaleza de las enfermedades, su contagio y desarrollo entre la población, han conducido a la publicación de diversos trabajos epidemiológicos, médicos y sobre las bases científicas de las patologías. Las formas de contagio son muy variadas; las enfermedades respiratorias se diseminan a través de la inhalación de gérmenes del aire, o por contacto directo con la saliva o con manos no lavadas adecuadamente; pero en otros casos la enfermedad puede propagarse a través de fluidos corporales. La Organización Mundial de la Salud, dada la gran movilidad de la

población actual, ha alertado sobre la rapidez con la que una epidemia puede diseminarse en nuestros días, lo que por desgracia ya se ha podido comprobar recientemente.

Diversas pandemias han ido apareciendo a lo largo de la historia de la humanidad. La peste, la viruela, la gripe, la tuberculosis, la fiebre amarilla, etc., se han sucedido a lo largo de los siglos. La pandemia de la peste negra o brote de peste bubónica, que hoy sabemos que está causada por la bacteria *Yersinia pestis*, de gran virulencia y letalidad, acaeció durante varios siglos (XIV al XVII). En el siglo XIV fue devastadora; entre los años 1348 y 1400 causó la muerte de cerca de un tercio de la población europea. Una ilustración de la biblia de Toggenburg de 1411 sobre la muerte por la peste negra se recoge en la Figura 1.

La viruela, enfermedad infecciosa grave y contagiosa causada por el virus variola, fue en el siglo XVIII el mayor azote de la humanidad, dando cuenta de alrededor de 60 millones de muertos. Para esta enfermedad no se ha descrito un tratamiento terapéutico; la única forma de prevención es la vacunación. El nombre viruela proviene del latín *varus* o barro, que hace referencia a las marcas que permanecen en la cara y en el cuerpo de una persona infectada. El poeta y dramaturgo inglés Ben Johnson (1572-1637) le rogaba a la viruela que “dejara al menos una persona bella de cada generación”. El efecto preventivo de la vacuna, que descubrió en 1796 Edward Jenner, redujo sustancialmente la mortalidad. Jenner abrió las puertas a la vacunación; en 1798 acuñó el término *variolae vaccinæ* (viruela de la vaca) en su trabajo “*An inquiry into the causes and effects of the variolæ vaccinæ*”, cuya primera página se reproduce en la Figura 2. Estos trabajos fueron continuados en los años siguientes: en 1799 publica “*Further observations on the variolæ vaccinæ*”, y en 1800 “*A continuation of facts and observations relative to the variolæ vaccinæ*” [15]. En 1870 Francia y Alemania propusieron una vacunación forzosa. En la epidemia de 1890 en España, la enfermedad es catalogada como una vergüenza social: “falta de previsión de autoridades y escasa cultura del pueblo han facilitado la resurrección de una patía dieciochesca”. En 1979 la Organización Mundial de la Salud declaró erradicada la viruela.



**Figura 2.** Portada del trabajo original de Edward Jenner describiendo la primera vacuna contra la viruela (obtenida del documento digitalizado por Google).

A principios del siglo XIX, erradicada la peste bubónica y estando la viruela en retirada, el cólera hereda los efectos destructores sobre las sociedades; su potencia mortífera era similar a la que en otros siglos había poseído la peste. El cólera es una enfermedad aguda causada por la bacteria gram-negativa *Vibrio cholerae*, la cual provoca una infección intestinal que se manifiesta en forma de diarreas que pueden conducir a la muerte por deshidratación [16]. El contagio se produce habitualmente a través del agua y también de los alimentos contaminados. Influye la higiene personal, la alimentación, la vivienda, los abastecimientos, etc., por lo que las desigualdades sociales afectan a la enfermedad: respeta a las clases sociales altas pero es un azote a las clases sociales bajas, por lo que es también llamada “la enfermedad de los pobres”. El foco endémico originario se localizó en el valle del Ganges (India). El cólera ha producido varias epidemias, algunas de ellas de alcance prácticamente mundial, como la que partiendo de la India, el “cólera asiático”, asoló Europa a principios del siglo XIX pro-

duciendo un cataclismo demográfico. En 1831, en Hungría se contabilizaban cerca de 300.000 víctimas. Varias pandemias de cólera han afectado a España, como en 1833-34 (300.000 muertes; 2,25% de la población), en 1853-55 (236.000 muertes), en 1865 (119.000 muertes) y en 1885 (120.000 muertes). En el brote de 1890 en Madrid se produce una triple epidemia; en este caso el cólera no se cobra ningún fallecimiento pero la gripe y la viruela provocan 3.000 muertes cada una de ellas [17]. En la actualidad, ya que las epidemias de cólera todavía emergen en países subdesarrollados, se atiende a la importancia de las vacunas para su control [18].

La gripe se presenta en epidemias estacionales desde el siglo XVI; desde 1510 se han descrito una treintena de pandemias y, en el siglo XX, fue otro de los grandes azotes para la humanidad [19]. El primer registro detallado sobre una pandemia de gripe procede de 1850. Una de las pandemias más virulentas y de gran morbilidad fue la de 1830-1833 que infectó a casi una cuarta parte de la población expuesta. A diferencia del cólera, que respeta a las clases sociales acomodadas, la gripe reparte democráticamente sus ataques. La gripe está causada por virus RNA de la familia de los *Orthomyxoviridae*, los virus influenza tipos A, B y C. El virus de la influenza A se compone de una cubierta proteica o cápsida que contiene el genoma viral, una sola hebra de RNA. Uno de los genes codifica para la hemaglutinina (HA, hay 16 subtipos de HA), un antígeno de superficie que utiliza el virus para unirse y penetrar en las células del huésped. Un segundo gen produce otro antígeno de superficie, la neuraminidasa (NA, hay nueve subtipos de NA), que ayuda a que los virus recién formados se liberan para infectar a otras células al romper la unión entre la hemaglutinina y el ácido siálico de las células infectadas. Los humanos han estado expuestos a los virus H1, H2, H3 y, más recientemente, al H5N1 [20, 21]. Ya que se pueden producir cambios en los antígenos de superficie HA y NA, la vacuna humana habitual contiene proteínas purificadas e inactivadas de las cepas del virus que se consideran que van a ser más comunes en la siguiente epidemia. La historia de las epidemias es larga y dilatada en el tiempo. La pandemia de gripe de 1890, conocida como la gripe rusa, se considera uno de los cataclismos del siglo XIX, con un cálculo de un millón de muertes. En 1918-1919 la gran pandemia de gripe, y la más letal, se conoce como la gripe española,

y con otros nombres como “la pesadilla” o “la cucaracha”. Fue un brote del virus influenza tipo A (subtipo H1N1) que pudo haber matado a 25 millones de personas en las primeras 25 semanas; algunas estimaciones no tan optimistas sitúan la cifra final de fallecimientos en todo el mundo en más de 50 millones, e incluso 100 millones [22, 23]. Su tasa de incidencia fue elevada, alrededor de una tercera parte de la población del planeta de aquel tiempo; teniendo en cuenta que la tasa de mortalidad se estima que era entre el 10% y el 20%, se calcula que falleció entre el 3% y el 6% de la población mundial. España fue uno de los países más afectados con cerca de 8 millones de personas infectadas en mayo de 1918 y alrededor de 300.000 muertes, aunque las cifras oficiales reducen las víctimas a 147.000. Los primeros casos de gripe se detectaron en Fort Riley, Kansas (EEUU) el 11 de marzo de 1918. Los Aliados de la Primera Guerra Mundial la llamaron *gripe española* porque la pandemia recibió una mayor atención de la prensa en España que en el resto del mundo, ya que España no estuvo involucrada en la guerra y, por tanto, no se censuró la información sobre la enfermedad. En archivos se conserva documentación fotográfica sobre la pandemia de gripe española; la Figura 1 muestra una de las fotografías de un hospital de campaña montado para albergar a numerosos pacientes [21].

A lo largo del siglo XIX la etiología de la gripe recibió numerosas consideraciones; tras descripciones no acertadas, la propuesta etiología bacteriana de la gripe dio paso a una etiología viral. Richard Friedrich J. Pfeiffer (1858-1945), quien también trabajó sobre el cólera y desarrolló el concepto de endotoxina, en 1892 descubrió en la garganta de pacientes que murieron por la gripe una bacteria. Era el bacilo *Haemophilus influenzae* o bacilo de Pfeiffer, el cual fue considerado erróneamente la causa de la gripe común. La génesis viral de la enfermedad no se confirmó definitivamente hasta 1933, cuando se identificó el virus en humanos por Smith, Andrews y Laidlaw [24] y se aisla en 1934 [25]. Otras epidemias de gripe posteriores son la gripe asiática (1957-58; provocada por el virus subtipo H2N2 con 1-1,5 millones de muertes) y la gripe de Hong Kong (1968-69; causada por el virus subtipo H3N2 y con 0,75-1 millón de defunciones). Ya en nuestro siglo, en 2003 se describió en Asia la gripe aviar producida por el virus influenza A (subtipo H5N1). Aunque el virus aviar no infecta a humanos, se

detectaron más de 250 casos de infección con una mortalidad asociada de cerca del 60% [20]. En 2009, en México y EEUU se detecta el brote de gripe porcina, posteriormente llamada gripe A (subtipo H1N1) [26], y el virus causante de la epidemia se caracteriza *in vivo e in vitro* el mismo año.

En el año 2003 un equipo multidisciplinar se planteó analizar las causas de la pandemia del virus de la gripe de 1918. Dos años más tarde la revista *Science* publica la reconstrucción, por primera vez en la historia, de un virus totalmente extinguido, el virus de la gripe de 1918 (H1N1) [27]; el virus fue totalmente reconstruido *in vitro* a partir de las secuencias obtenidas del análisis de muestras históricas de tejidos. La finalidad de esta reconstrucción era realizar estudios de infectividad, identificando genes responsables de su virulencia y la de otros virus de la gripe, incrementando así el conocimiento sobre el virus y las dianas para su terapia, lo que podría permitir estar preparados para responder a futuras pandemias de gripe [28]. De hecho, se ha descrito que la especificidad del receptor de hemaglutinina es esencial para la transmisión del virus de la gripe entre mamíferos [29]. Además, análisis genómicos han mostrado que el virus bloquea la transcripción de múltiples genes estimulados por el interferón, disminuye la expresión de genes de mediadores proinflamatorios e incrementa la de genes de citoquinas y quimioquinas implicados en el reclutamiento de células inmunes. Por tanto, el virus afecta a la respuesta inmune innata modificando genes que son parte de la respuesta antiviral de la célula [30].

La tuberculosis es la enfermedad que mayor número de muertes ha causado en la historia de la humanidad (1,9 millones de muertos en 2005); el agente etiológico es la *Mycobacterium tuberculosis* o bacilo de Koch, su descubridor en 1882. Destruye el tejido pulmonar y se transmite por vía respiratoria [31]. Es también una enfermedad ligada a deficiencias socio-sanitarias, pobreza, hacinamiento y desnutrición. Actualmente afecta a 2.500 millones de personas; se estima que está infectada una tercera parte de la población mundial y se calcula que cada año se producen alrededor de 8 millones de casos nuevos y 2 millones de fallecimientos. En España la incidencia es de 40 enfermos por cada 100.000 habitantes/año, una frecuencia cuatro veces superior a la de otros países con un nivel de desarrollo similar. En estos países la enfer-

medad ha quedado casi limitada a ancianos o grupos marginales, aunque actualmente se detectan casos en adultos jóvenes, ligados a la epidemia de infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y a la inmigración procedente de países donde la infección tuberculosa es frecuente. El diagnóstico de la infección se hace con la prueba de la tuberculina o intradermorreacción de Mantoux, que consiste en la inyección de una pequeña cantidad de tuberculina en la piel del antebrazo y la observación del eritema y de la induración formados tres días después. La vacunación, como medida preventiva, ha reducido considerablemente las tasas de incidencia y mortalidad en muchos países.

## LAS VACUNAS COMO PREVENCIÓN DE LAS EPIDEMIAS

El efecto preventivo de las vacunas lo descubre, en 1796, Edward Jenner quien realizó la primera inoculación contra la viruela. James Phipps, un niño de ocho años de edad, fue el primer inoculado con la secreción recogida de una *pústula vacuna* (viruela de vacas o viruela bovina provocada por el virus cowpox) de una lechera que se había infectado al ordeñar vacas que padecían la enfermedad. Posteriormente inoculó de nuevo al pequeño, esa vez con pus procedente de una persona enferma de viruela. Éste quedó indemne, con lo cual se demostró la acción profiláctica de la inoculación contra la viruela humana. La vacuna original de Jenner contra la viruela, y el origen de la idea de la vacunación, es el virus cowpox llamado en aquella época *variolae vaccinae* (viruela bovina), de ahí el nombre de vacunación. Desde entonces, los conocimientos sobre los microorganismos, las bases moleculares de acción de los mismos, y las posibilidades tecnológicas actuales han hecho que las vacunas se vayan perfeccionando cada vez más para evitar pandemias [32].

Para la fabricación de las vacunas clásicas se utilizan los microorganismos patógenos vivos atenuados, (como en el caso del sarampión, las paperas y la rubeola), o inactivados (gripe); estos microorganismos son tratados por medios físicos o químicos para eliminar su infectividad, pero mantienen su capacidad inmunogénica sin causar la enfermedad. Las vacunas contra la difteria y el tétanos son vacunas denominadas

toxoides: contienen una toxina producida por el microorganismo que no manifiesta su acción tóxica porque está modificada (por ejemplo, por efecto del calor o con formol), pero que mantiene sus propiedades en cuanto a una inmunización específica. Uno de los ejemplos de vacunas conjugadas es el del *Streptococcus pneumoniae*, uno de los gérmenes bacterianos que con mayor frecuencia produce infecciones en los niños (neumonía, meningitis, otitis). En la preparación de una de las vacunas se ha utilizado la conjugación de los polisacáridos de los neumococos a una proteína transportadora para mejorar la respuesta inmunológica [33, 34]. Actualmente existen dos tipos de vacunas antineumocócicas, la vacuna polisacárida 23-valente y la polisacárida conjugada pentavalente. Esta última incluye siete antígenos polisacáridos conjugados de la cápsula de *S. pneumoniae* (serotipos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F), cada uno de los cuales se encuentra unido a una variante no tóxica de la toxina diftérica (CRM197). También se encuentran en estudio las vacunas obtenidas por ingeniería genética basadas en técnicas del DNA recombinante, que implican la utilización de vectores derivados de virus, como se comentará en el caso de la evolución de las vacunas frente al virus vaccinia. Para preparar muchas de las vacunas actuales frente a virus, para enfermedades como la polio, el sarampión, las paperas, la rubeola y la varicela, se utilizan cultivos de células de mamíferos para la propagación de los correspondientes virus y como método de atenuación, como se comentará posteriormente.

De entre las vacunas desarrolladas con éxito, a continuación se hacen algunos apuntes sobre la de la tuberculosis, la de la fiebre amarilla y la de la poliomielitis. La primera vacuna frente a la tuberculosis se elaboró en 1921 por Albert Calmette (1863-1933) y Camille Guérin (1872-1961) (vacuna BCG: Bacilo de Calmette y Guérin), preparada a partir de bacilos de Koch vivos atenuados de una cepa de *Mycobacterium bovis*. El tratamiento con una mezcla de antibióticos, en la que cada uno de ellos tiene un mecanismo de acción diferente (estreptomicina, isoniacida etambutol y rifampina), y la vacuna ha eliminado la tuberculosis en países desarrollados pero han emergido algunas cepas resistentes. Por ello, y considerando que la vacuna BCG no es muy efectiva frente a la tuberculosis pulmonar de adultos, se están desarrollando otras vacunas [35]. En la actualidad se está llevando a cabo

por el grupo de Pere Joan Cardona la primera fase de un ensayo clínico con una vacuna contra la tuberculosis latente, bautizada como RUTI, por el nombre popular del hospital, Can Ruti de Badalona (Barcelona). Se espera que se pueda aplicar en el año 2012 [36].

La fiebre amarilla, o vómito negro, es una enfermedad viral aguda e infecciosa causada por “el virus de la fiebre amarilla” un virus del género flavivirus amarillo. En 1937 Max Theiler (1899-1972) desarrolló la vacuna 17D contra la fiebre amarilla, que supuso cultivar el virus a lo largo de 400 subcultivos de células primarias de ratón y de pollo [37]. La poliomielitis, descrita por primera vez en 1840 como una “parálisis espinal infantil” por Jakob von Heine (1800-1879), es una enfermedad contagiosa producida por el virus de la polio y caracterizada por provocar parálisis, atrofia muscular y, frecuentemente, deformidades. Jonas E. Salk (1914-1995) desarrolló en 1952 una vacuna inyectable de poliovirus inactivados (vacuna Salk) que empezó a utilizarse en 1955 [38]. Los virus se propagan en cultivos de células Vero (de tejido epitelial renal de mono) y son inactivados posteriormente con formol. Años después, en 1961, se autorizó la vacuna de virus vivos atenuados, de administración oral, desarrollada por Albert Bruce Sabin (1906-1993) [39]. La atenuación del virus se produce cultivando, y propagando por períodos de tiempo largos, el virus en células no humanas a temperaturas inferiores a la temperatura fisiológica, lo que provoca mutaciones espontáneas del genoma viral. Se seleccionan aquellos virus cuya infectividad es mínima y que producen una mayor respuesta inmunológica. La atenuación del virus produce mutaciones puntuales en el RNA mensajero viral localizadas en el sitio de entrada del ribosoma; éstas alteran la capacidad para traducir el RNA mensajero viral en la célula huésped [40]. Con las campañas de vacunación contra la poliomielitis, en 2002, la Organización Mundial de la Salud declaró a Europa libre del virus de la polio. En otros continentes ha disminuido considerablemente el número de casos; es una de las enfermedades que pueden ser erradicadas en un futuro no muy lejano.

Como ejemplo de desarrollo de vacunas y potenciales aplicaciones de los virus, consideraremos el virus vaccinia o virus vacuna (virus DNA, con un genoma grande y complejo con unos 250 genes) uti-

lizado en la erradicación de la viruela, y que todavía es actualmente un centro de interés para la generación de nuevas vacunas [37]. Para eliminar efectos adversos (dolor de cabeza, náuseas, fatiga, etc.), evitar la utilización de animales e incrementar la efectividad de la primera vacuna, la jenneriana, se describió una vacuna de segunda generación. Ésta se producía inoculando el virus en huevos de embrión de pollo o tras su propagación en cultivos de células Vero [41]. Para la vacuna de tercera generación se buscó provocar una alteración del genoma del virus para crear una forma no replicativa o altamente atenuada pero que mantuviera sus propiedades como agente inmunizante frente a la viruela. Esto se consiguió propagando el virus durante períodos muy largos de tiempo, alternando cultivos de células procedentes de diferentes tejidos y especies; la obtención de estos virus atenuados es laboriosa y requiere largo tiempo. La vacuna de cuarta generación se ha preparado contando con el desarrollo de la tecnología del DNA recombinante y los avances en técnicas de Biología Molecular y Biotecnología. El material genético del virus se manipula por delección de genes esenciales; se eliminan uno a uno y se estudian las características de los nuevos virus obtenidos deficientes en un gen. Además, se insertan genes que modulen la respuesta inmunológica, como el de la interleuquina-15, una citoquina con funciones inmunoestimuladoras potentes [42, 43]. Por último, cabe resaltar que la manipulación genética de este virus ha posibilitado su utilización para nuevas vacunas frente a agentes heterólogos. Así, se han usado virus vaccinia que han perdido el gen de la timidina quinasa viral y se ha insertado un gen que expresa una proteína del virus de la rabia; la vacuna preparada con este sistema ha sido efectiva en la inmunización de coyotes y zorros y, por tanto, en el control de la rabia [37]. Por otro lado, este virus es eficiente para la infección de células tumorales por lo que se considera un potencial agente antitumorigénico de la viroterapia oncolítica [44, 45]. El virus vaccinia no es el único que se manipula para conseguir una mayor efectividad, otro ejemplo es el poliovirus [46].

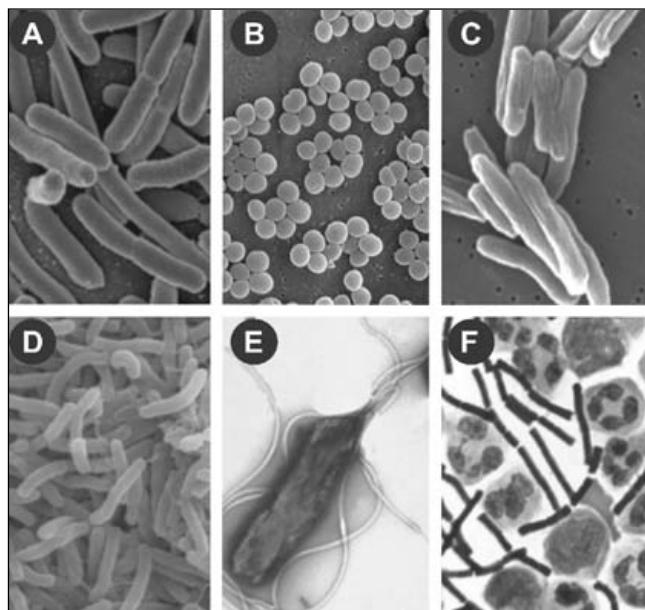
El químico suizo Peter Seeberger recibió el Premio Körber 2007 a la Ciencia Europea por su investigación pionera sobre la elaboración de vacunas contra enfermedades como la malaria. Desarrolló un sintetizador automático de oligosacáridos. Por síntesis química se obtienen los oligosacáridos, o hidratos de carbono

complejos, con estructura similar a la de patógenos concretos. Ya que la respuesta inmunológica frente a hidratos de carbono es débil, éstos se acoplan a un vehículo o proteína no inmunológica para que el sistema inmunológico desarrolle anticuerpos frente a los oligosacáridos. Con ello se consigue una protección en el caso de que un agente patógeno natural entre en el organismo. Ya se han caracterizando diversos patógenos y se encuentran en diferentes fases de desarrollo algunas vacunas candidatas contra el ántrax, la malaria, la leishmaniasis, el sida y la tuberculosis [47, 48]. El sintetizador automático de oligosacáridos también se puede aplicar al diagnóstico mediante los llamados *microarrays* o micromatrizes que permiten ensayar múltiples muestras de forma rápida.

## LAS BACTERIAS

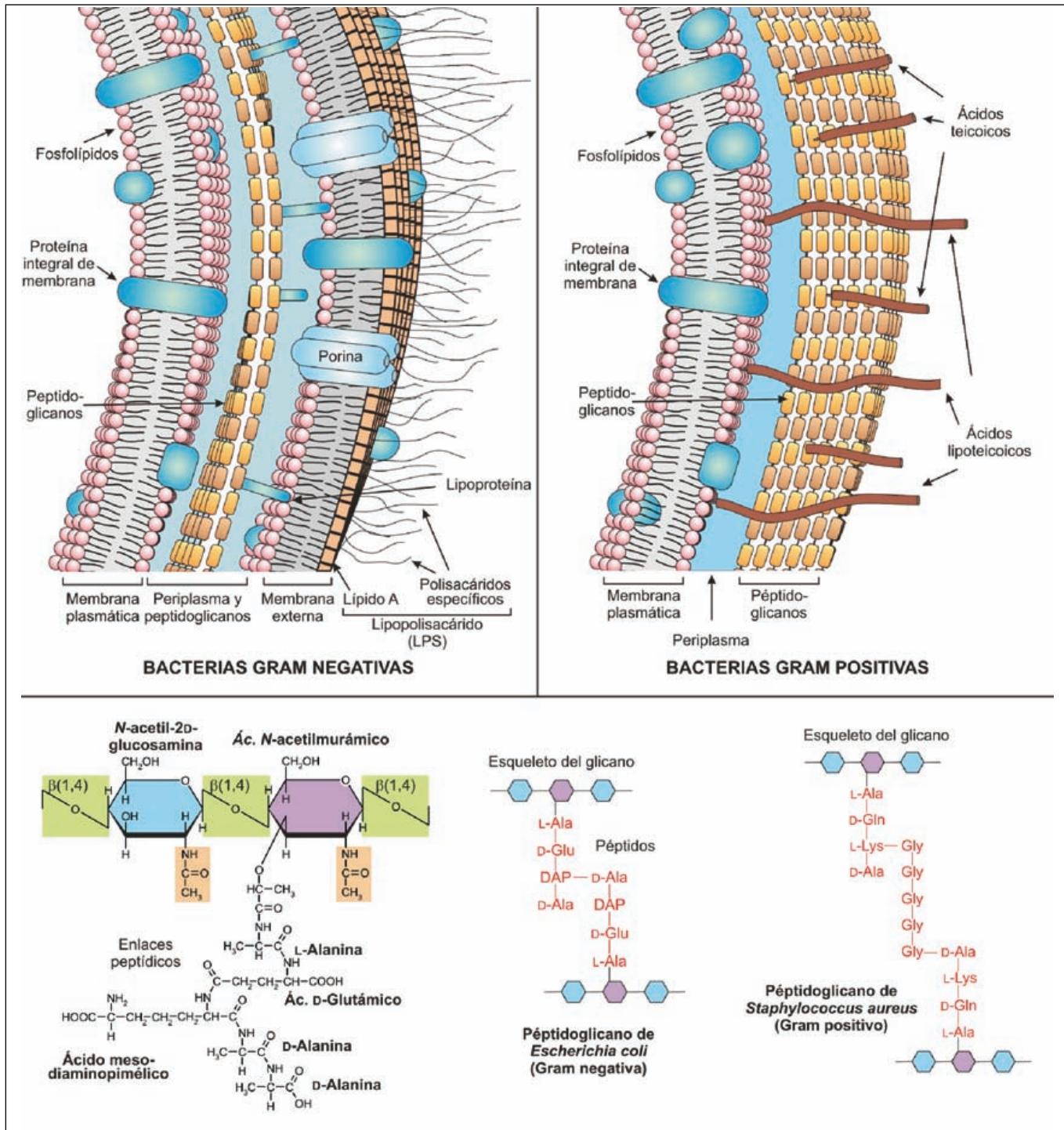
Las bacterias, células procarióticas sin núcleo definido, tienen una estructura sencilla cuando se comparan con las células eucariotas; sus formas y tamaños son variados. Algunas bacterias formas endosporas resistentes para sobrevivir en ambientes extremos en estado de reposo. De acuerdo a su forma las bacterias pueden ser bacilos (bastones), cocos (forma redondeada) y espirilos (formas espirales o helicoidales); en la Figura 3 se muestran micrografías electrónicas de diferentes bacterias. El tamaño puede oscilar desde las más pequeñas (nanobacterias), con un diámetro menor que 0,2  $\mu\text{m}$ , a las de mayor tamaño, de longitud alrededor de los 500  $\mu\text{m}$  (espiroquetas). En 1991, Kendall D. Clements y Stanley Bullivant propusieron que el supuesto protista *Epulopiscium fishelsoni* podría ser una bacteria gigante con un volumen mil veces superior al de *E. coli* (puede alcanzar un tamaño de 200-700  $\mu\text{m}$  de longitud por 80  $\mu\text{m}$  de diámetro), hecho que se confirmó posteriormente en 1993 por Angert y colaboradores [49, 50]. Con posterioridad, en 1997 se descubrió una bacteria aún mayor, *Thiomargarita namibienses*, con diámetros entre 300 y 750  $\mu\text{m}$ , publicándose estos resultados en 1999 en la revista *Science* [51].

Las bacterias carecen de sistemas de membranas internas y en el citoplasma se localizan los cuerpos de inclusión, los ribosomas y el nucleoide con el material genético. Poseen una membrana plasmática y una



**Figura 3.** Micrografías electrónicas mostrando la morfología de diferentes bacterias. (A) Cultivo de *Escherichia coli*. (B) Cultivo de una cepa de la bacteria *Staphylococcus aureus* resistente a vancomicina. (C) Detalles de la bacteria gram-positiva *Mycobacterium tuberculosis*. (D) Bacteria *Vibrio cholerae* que infecta el aparato digestivo. (E) Bacteria *Helicobacter pylori* mostrando numerosos flagelos sobre la superficie celular. (F) Bacteria gram-positiva *Bacillus anthracis* (tenido de púrpura) desarrollándose en el líquido cefalorraquídeo; cada pequeño segmento es una bacteria. Microscopía electrónica de barrido de superficie (A-D), (E) microscopía electrónica de transmisión (F) tinción de Gram.

pared celular que es química y morfológicamente compleja que contiene péptidoglicanos. Éstos capacitan a la bacteria para resistir la presión intracelular evitando que se produzca una lisis osmótica, les protege frente a sustancias tóxicas, es el blanco de acción de varios antibióticos y les permite adoptar una forma definida que se transmite de generación en generación. La mayoría de las bacterias se clasifican en gram-positivas y gram-negativas, en función de la pared celular y la respuesta a la tinción con el reactivo de Gram. En la Figura 4 se representa la estructura de la pared celular de bacterias gram-positivas y gram-negativas. La estructura química y la composición del péptidoglicano son distintas a la de cualquier otra estructura o macromolécula de mamíferos. La pared de una bacteria gram-negativa es compleja, posee una capa de péptidoglicanos que rodea la membrana plasmática y una membrana externa, mientras que la pared de las bacterias gram-positivas está formada por una capa de péptidoglicanos separada de la membrana plasmática por el espacio periplásmico. El constituyente básico de



**Figura 4. Esquema de la pared bacteriana.** La pared de una bacteria gram-negativa posee, rodeando la membrana plasmática, una capa de peptidoglicanos y una membrana externa. La pared de una bacteria gram-positiva, más sencilla, está formada por una capa de peptidoglicanos separada de la membrana plasmática por el espacio periplasmático. En la parte inferior de la figura se muestra la composición de la subunidad del péptidoglicano. El esqueleto del glicano contiene dos tipos de hidratos de carbono (NAG: N-acetilglucosamina y NAM: ácido N-acetilmurámico) y una corta cadena con cinco aminoácidos. En el péptidoglicano de bacterias gram-negativas la cadena peptídica está formada por un aminoácido proteico (L-Ala) y aminoácidos no proteicos (D-Ala, D-Glu y ácido meso-diaminopimético). Las cadenas de glicano se unen por enlaces de covalentes establecidos entre las cadenas de aminoácidos perdiéndose un residuo de D-Ala y quedando las cadenas de tetrapéptidos entrecruzadas. En el péptidoglicano de bacterias gram-positivas, las cadenas peptídicas tienen una composición en aminoácidos diferente y también difieren en el entrecruzamiento que se establece con la participación de un pentapéptido de Gly.

la pared celular es el péptidoglicano. Éste está formado por un esqueleto de glicano en el que se alternan dos tipos de hidratos de carbono la N-acetilglucosamina y el ácido N-acetilmurámico, al que está unida una cadena peptídica de cinco aminoácidos. En el péptidoglicano de bacterias gram-negativas la cadena peptídica está constituida por un aminoácido proteico (L-Ala) y aminoácidos no proteicos (D-Ala, D-Glu y ácido meso-diaminopimélico). Las cadenas de glicano se unen estableciendo enlaces covalentes a través de las cadenas de aminoácidos; se pierde un residuo de D-Ala quedando las dos cadenas de tetrapéptidos entrecruzadas. Las bacterias gram-positivas también contienen ácidos teicoicos (polímeros de glicerol y ribitol unidos por grupos fosfato). Los ácidos teicoicos se unen covalentemente al hidroxilo de la posición 6 del ácido N-acetilmurámico o a los lípidos de membrana, denominándose en este último caso ácido lipoteicoico. Este tipo de enlaces genera entrecruzamientos covalentes entre las cadenas de glicanos, proporcionando una estructura compacta y estable. En el péptidoglicano de bacterias gram-positivas, las cadenas peptídicas tienen una composición en aminoácidos algo diferente: en lugar de ácido meso-diaminopimélico contienen L-Lys y el entrecruzamiento se establece con la participación de un pentapéptido de Gly u otro tipo de péptidos cortos. Además, el grosor de esta capa de peptidoglicanos suele ser muy superior al de las bacterias gram-negativas. En las bacterias gram-negativas, una proteína de membrana, la lipoproteína de Braun, está unida covalentemente al péptidoglicano y se incluye en la membrana externa. Los lipopolisacáridos son constituyentes de la membrana externa al igual que las porinas, que forman trímeros que atraviesan dicha membrana formando canales o poros que permiten el paso de moléculas de baja masa molecular. La estructura resultante de la pared de las bacterias gram-negativas puede funcionar como barrera protectora, reduciendo la permeabilidad a moléculas tóxicas y a antibióticos y, por tanto, disminuyendo su eficacia terapéutica.

Las denominadas proteínas de unión a penicilina (PBP, *Penicillin Binding Proteins*) catalizan la polimerización de las cadenas de glicano (reacción de transglucosilación) y su entrecruzamiento (reacción de transpeptidización) [52, 53]. Dependiendo del tipo de bacteria, poseen un número variable de PBP. Estas proteínas son multimodulares y multifuncionales y, en

algún caso, monofuncionales; en conjunto, son responsables de la polimerización del péptidoglicano, de su inserción en la pared celular y de su recambio. En función de su estructura y de la actividad catalítica del dominio amino-terminal se clasifican al menos en dos grupos, las clases A y B. En ambos tipos, la actividad transpeptidasa reside en el dominio carboxilo-terminal, donde se une la penicilina. En la clase A, el dominio amino-terminal es responsable de su actividad de transglucosidasa, catalizando la elongación de las cadenas de glicanos no entrecruzados, mientras que en la clase B este dominio parece desempeñar un papel en la morfogénesis celular interaccionando con otras proteínas implicadas en el ciclo celular [54].

Uno de los organismos procariontes más estudiado y que se ha utilizado ampliamente en investigación es la bacteria *E. coli*; fue una fuente clave para el conocimiento de rutas metabólicas y procesos de regulación. Es un bacilo anaeróbico facultativo y gram-negativo. En 1885 fue descrita por el bacteriólogo alemán Theodore von Escherich, quién la llamó *Bacterium coli*, pero posteriormente se renombró como *Escherichia coli*, en honor a su descubridor [55]. En *E. coli* se han estudiado con detalle las PBP; se han descrito hasta 12 PBP, 3 de la clase A, dos de la clase B y siete de baja masa molecular (LMM, *Low Molecular Mass*). Dos de la clase A, PBP1a y PBP1b, son las principales transpeptidasas-transglucosilasas y la deleción de alguna de ellas es letal para la bacteria [56]. Las LMM están implicadas en la maduración o el reciclaje del péptidoglicano; entre ellas hay dos endopeptidasas (PBP4 y PBP7) que rompen los enlaces de entrecruzamiento entre las cadenas de glicano, y la PBP5 tiene actividad de carboxipeptidasa, rompiendo el enlace D-Ala-D-Ala del pentapéptido incapacitándolo para la reacción de transpeptidización [53].

Dada la similitud estructural entre el sustrato natural (D-Ala-D-Ala) del pentapéptido precursor y la penicilina y demás β-lactámicos, las enzimas que participan en la última etapa de la síntesis del péptidoglicano son sensibles a penicilina. Ésta forma un complejo acil-enzima que no tiene capacidad para entrecruzar el péptidoglicano [57]. Además, la inhibición produce una acumulación de los precursores del péptidoglicano, los cuales inducen la activación de enzimas como hidrolasas y autolisinas que

participan en la degradación del péptidoglicano remanente. La expresión de diferentes tipos de proteínas PBP que se expresan difiere en función de la bacteria considerada. Además, el grado de sensibilidad de las PBP frente a diferentes  $\beta$ -lactámicos es también muy variable [52, 53].

Las bacterias disponen de mecanismos mediante los cuales se intercambian fragmentos de DNA: la transformación, la transducción y la conjugación. Los plásmidos son pequeñas moléculas de DNA extracromosómico localizados en el citoplasma de las bacterias y que determinan ciertos rasgos no vitales, pero de los que dependen para adaptarse a diferentes condiciones. Los plásmidos portan solamente unos pocos genes y pueden ser transferidos de una bacteria a otra durante la conjugación bacteriana. Este mecanismo es responsable de la resistencia de las bacterias a los antibióticos; por ejemplo, el plásmido pBR322 contiene genes que codifican la resistencia a ampicilina y tetraciclina. En investigación, los plásmidos fueron los primeros vectores de clonación que se utilizaron.

## ALGUNOS DESCUBRIMIENTOS CLAVE EN EL DESARROLLO DE LA BACTERIOLOGÍA

La incorporación de protocolos higiénicos y la generalización del uso de los antibióticos tras el descubrimiento de la penicilina, cambió de forma radical el panorama de las enfermedades infecciosas que habían sido una de las primeras causas de muerte. En la Tabla I se recogen algunos de los descubrimientos y científicos más relevantes que constituyen el germen de la Bacteriología [51, 58-91]; otros muchos nombres deberían ser incorporados pero siempre una recopilación de autores, sin ánimo de profundizar en esta parte de la historia, está basada en una selección personal y en los límites que impone un tema amplio como el aquí presentado. De igual forma, los comentarios que a continuación se desarrollan son simplemente un pequeño extracto de lo que se podría seleccionar. Además, ¿hasta cuándo se puede considerar un hecho como histórico? En la Tabla I se incluyen algunos datos de finales del siglo XX y de este siglo, aunque la relación de los que se podrían enumerar es mucho mayor; en este siglo se destaca, a modo de ejemplo, la secuenciación completa de los genomas de

diversos microorganismos. Algunos premios Nobel relacionados con la Bacteriología se presentan también en la Tabla I. Una extensa revisión de aspectos históricos se recoge en Historia de la antibioterapia [92]. En la literatura científica de los últimos años, el número de publicaciones en las que aparecen los términos bacteria o antibiótico es inmenso; así, en los años 2007, 2008, 2009 y primer trimestre de 2010 aparece el término “bacteria” 67.735, 70.195, 67.397 y 1.002 veces, y “antibiótico” 18.581, 19.508, 18.420 y 3.481 veces.

El establecimiento de la relación causal entre una enfermedad específica y el agente que la produce, como los descubrimientos iniciales acerca de los microorganismos y enfermedades asociadas, fue la base para el desarrollo de la Microbiología y la Virología. De la antigüedad, cabe señalar al médico de la antigua Grecia, Hipócrates de Cos (460 a.C.-370 a.C.), considerado como el padre de la Medicina. Rechazó las supersticiones y creencias populares, que señalaban a las fuerzas divinas como causantes de las enfermedades, y realizó observaciones sobre varias enfermedades infecciosas.

A mediados del siglo XIX se refuta la teoría de la generación espontánea con numerosas pruebas experimentales. Friedrich Gustav Jakob Henle, en 1840, defendió desde un punto de vista científico el origen microbiano de las enfermedades contagiosas y la especificidad de los gérmenes. Louis Pasteur descubre en 1857 la especificidad de las fermentaciones microbianas implicadas en la elaboración del queso, la cerveza y el vino y, entre 1877 y 1895, extendió el concepto a las enfermedades. Pasteur realizó la primera observación de lo que hoy denominamos efecto antibiótico; descubrió que algunas bacterias saprófitas podían destruir gérmenes del carbunco (ántrax) y desarrolló la vacuna contra la rabia [61]. En 1878 se populariza el concepto de la teoría sobre el origen microbiano de algunas enfermedades; a ello contribuyeron Pasteur y Koch, entre otros. En 1884 Henle, Koch, Loeffler y Chamberland establecen los criterios requeridos para proponer a un microorganismo como la causa u origen de una enfermedad, lo que quedó afianzado con los postulados de Henle-Koch. A finales de siglo (1888-1890) el descubrimiento de las toxinas microbianas y las antitoxinas (Loeffler, Roux, Yersin, von Behring) y el del virus del mosaico del tabaco

TABLA I: Algunos descubrimientos clave en el desarrollo de la Bacteriología

Año*	Investigador	Descubrimiento
<b>SIGLO XVI</b>		
1546	Girolamo Fracastoro (1478-1553)	Se le considera uno de los padres de la Epidemiología. Su obra “ <i>De contagione et contagiosis morbis eorumque curatione</i> ” (Sobre el contagio y las enfermedades contagiosas y su curación) es el primer compendio de enfermedades infecciosas. Estableció el concepto de enfermedad contagiosa y propone que las enfermedades están causadas por organismos invisibles. Introdujo el concepto “ <i>seminaria contagiorum</i> ” o semilla viva que provoca una enfermedad.
1595	Sacharias Jansen (1580-1638)	Se le atribuye, aunque con debate, el invento del microscopio compuesto (con dos lentes).
<b>SIGLO XVII</b>		
1668	Francesco Redi (1626-1697)	Demostró que los insectos no nacen por generación espontánea; fue uno de los primeros golpes que recibió la teoría de la generación espontánea.
1674-1676	Antonie van Leeuwenhoek (1632-1723)	Mejora el microscopio y es el primero en observar, en un microscopio de lente simple diseñado por él, tejidos y células y lo que él denomina “ <i>animaculus</i> ” (que hoy conocemos como protozoos). También realizó las primeras descripciones de bacterias y espermatozoides humanos. Se le considera el primer microbiólogo y uno de los padres de la Microbiología.
<b>SIGLO XVIII</b>		
1769	Lazzaro Spallanzani (1729-1799)	Continuando el estudio de Redi, investigó y refutó la teoría de la generación espontánea allanando el camino a Louis Pasteur.
1786	Otto Friedrich Müller (1730-1784)	Realiza el primer intento de clasificación de bacterias.
<b>SIGLO XIX</b>		
1828	Christian Gottfried Ehrenberg (1795-1876)	Acuñó el término bacteria, derivado del griego βακτηριον (“bastoncillo”), dado el aspecto alargado de las primeras bacterias que se descubrieron.
1835	Agostino Bassi (1773-1856)	Propone que muchas enfermedades son de origen microbiano a partir de la observación de que un hongo es el causante de una enfermedad del gusano de seda.
1838-1839	Theodor Schwann (1810-1882) y Matthias Jakob Schleiden (1804-1881)	Desarrollan la teoría celular.
1847-1850	Ignacio Felipe Semmelweis (1818-1865)	Demuestra que es necesaria la higiene y asepsia médica para evitar la fiebre puerperal. Es una figura médica pionera en antisepsia y prevención de la infección nosocomial (infecciones hospitalarias).
1854	John Snow (1813-1858)	Precursor de la Epidemiología. Estudió la epidemia de cólera de 1854 en Londres. Desarrolló un método epidemiológico para analizar causas y dar solución a las enfermedades transmisibles.

Año*	Investigador	Descubrimiento
1854	Filippo Pacini (1812-1883)	En su estudio “ <i>Osservazioni microscopiche e deduzioni patologiche sul cholera asiatico</i> ” [58], sobre el cólera de 1854 en Florencia, describió un bacilo en forma de coma que llamó <i>Vibrio</i> , el bacilo del cólera <i>Vibrio cholerae</i> .
1857-1885	Louis Pasteur (1822-1895)	Describe el papel de las bacterias y levaduras en el proceso de la fermentación. Idea la forma de matar a microorganismos con calor (proceso de pasteurización). Pone fin a la controversia sobre la generación espontánea con su “teoría germinal de las enfermedades infecciosas”. Obtuvo vacunas frente al cólera de los pollos [59], el ántrax [60] y la rabia [61] (ver Tabla V).
1885	Jaime Ferrán y Clúa (1851-1929)	Obtiene la primera vacuna frente al cólera en humanos a partir de cultivos de <i>Bacillus virgula</i> atenuados (descubiertos por Koch).
1865	Joseph Lister (1827-1912)	Desarrolló métodos antisépticos para la práctica quirúrgica, como por ejemplo, el calor o el uso del fenol como desinfectante.
1872	Ferdinand Julius Cohn (1828-1898)	Fue el primero en clasificar taxonómicamente, según su estructura, a las bacterias. Se le considera uno de los fundadores de la Bacteriología. En 1876 describe el cambio de un estado vegetativo a endospora (esporas de resistencia) en <i>Bacillus subtilis</i> .
1876-1884	Heinrich Hermann Robert Koch (1843-1910)	Su primer hallazgo fue el del bacilo de ántrax, agente causante del carbunco. Descubre la relación entre una enfermedad y una bacteria específica, el bacilo de la tuberculosis ( <i>Bacillus anthracis</i> o bacilo de Koch) y el bacilo del cólera ( <i>Vibrio cholerae</i> ). Aísla el microorganismo causante de una enfermedad y lo cultiva <i>in vitro</i> [62-64]. Elabora los postulados de Koch (1884) estableciendo los criterios para que un organismo sea el causante de una enfermedad. Recibió el Premio Nobel de Medicina o Fisiología en 1905 “por sus investigaciones y descubrimientos en relación con la tuberculosis”. Es considerado uno de los fundadores de la Bacteriología.
1883	Theodor Albrecht Edwin Klebs (1834-1913)	Describió el agente causante de la difteria, la bacteria claviforme <i>Corynebacterium diphtheriae</i> . Dicha bacteria también es conocida como el bacilo de Klebs-Loeffler. Otra de sus contribuciones fue el método de estudio con cortes de tejidos embebidos en parafina.
1884	Ilya Ilyich Mechnikov (1845-1916)	Descubre el proceso de fagocitosis. Formuló la “teoría fagocítica de la inmunidad”, para explicar la capacidad del cuerpo humano para resistir y vencer las enfermedades infecciosas [65]. Estudia la sífilis. Compartió, en 1908, el premio Nobel de Fisiología o Medicina con Paul Ehrlich por el “reconocimiento a su trabajo en el terreno de inmunidad”.
1884	Friedrich August Johannes Loeffler (1852-1915)	Comprobó las observaciones de Klebs. Cultivó el bacilo de la difteria <i>in vitro</i> y reprodujo en cobayas una infección con síntomas similares a los de la enfermedad humana. Llegó a la conclusión de que los bacilos, en el sitio de la infección, eran capaces de crear un factor soluble tóxico que podía ser transportado por el torrente sanguíneo a otros órganos [66].
1884	Christian Gram (1853-1938)	Desarrolló el método de la tinción de Gram que permite distinguir dos tipos de bacterias, gram-positivas y gram-negativas, en función de la estructura de la pared bacteriana.

Año*	Investigador	Descubrimiento
1884	Charles Chamberland (1851-1908)	Participa en un proyecto que condujo al desarrollo del autoclave. Diseña el filtro Chamberland-Pasteur.
1885	Theodore von Escherich (1857-1911)	Descubrimiento de la bacteria <i>Bacterium coli</i> renombrada en su honor como <i>Escherichia coli</i> .
1887	Julius Richard Petri (1852-1921)	Trabajó con Koch y diseñó la placa de cultivo (placa Petri).
1888	Sergei N. Winogradsky (1856-1953)	Estudió las bacterias del azufre y las bacterias nitrificantes. Descubrió el proceso biológico de la nitrificación, la primera forma conocida de quimioautotrofia.
1888	Martinus Willem Beijerinck (1851-1931)	Trabajó en Microbiología aplicada a la agricultura y a la industria. Entre otros, describe el principio de la fijación simbiótica del nitrógeno por leguminosas. Trabajó con virus (ver Tabla V).
1890	Emil Adolf von Behring (1854-1917)	Junto con Shibasaburo Kitasato (1852-1931) descubrió la antitoxina tetánica y la diftérica. Recibió en 1901 el primer premio Nobel de Fisiología o Medicina "por su trabajo en la terapia con suero, especialmente su aplicación contra la difteria, con el que abrió un nuevo camino en el ámbito de la ciencia médica y, por lo tanto, puso en manos del médico un arma victoriosa contra la enfermedad y la muerte".
1892	Giulio Bizzozero (1846-1901)	Descubridor de la bacteria <i>Helicobacter pylori</i> , que provoca la úlcera gástrica, aunque este descubrimiento no fue aceptado hasta casi un siglo después.
1894	Shibasaburo Kitasato (1852-1931) y Alexandre Emile John Yersin (1863-1943)	Demostraron independientemente que el microorganismo causante de la peste era la <i>Pasteurella pestis</i> , renombrada en 1967 como <i>Yersinia pestis</i> en honor a uno de sus descubridores.
1899	Walery Jaworski (1849-1924)	Describe una bacteria que vive en el estómago humano a la que llama <i>Vibrio rugula</i> (hoy, <i>Helicobacter pylori</i> ) [67].

#### SIGLO XX

1902	Ronald Ross (1857-1932)	En 1889 identificó la presencia de mosquitos portadores de la malaria y organizó su exterminio a gran escala. En 1895, descubrió que la malaria es transmitida por mosquitos, describiendo el ciclo vital del parásito que causa la malaria en el mosquito <i>Anopheles</i> . En 1902, fue galardonado con el premio Nobel en Fisiología o Medicina por "su trabajo sobre la malaria, en el que ha mostrado cómo entra en el organismo y ha establecido los fundamentos para una investigación exitosa sobre la enfermedad y los métodos para combatirla".
1905	Fritz Schaudinn (1871-1906) y Erich Hoffmann (1868-1959)	Descubrieron que la espiroqueta <i>Treponema pallidum</i> es el agente productor de la sífilis.
1909	Howard Taylor Ricketts (1871-1910)	Demostró que la fiebre de las Montañas Rocosas se transmitía a través de la picadura de ciertos insectos parásitos y describió a las bacterias parásitas causante de la enfermedad ( <i>Rickettsia rickettsii</i> ).

Año*	Investigador	Descubrimiento
1909	Charles Jules Henri Nicolle (1866-1936)	Trabajó en diversas enfermedades infecciosas como el tifus (producido por bacterias del género <i>Rickettsia</i> ) y la malaria (producida por parásitos del género <i>Plasmodium</i> ). Descubrió que el piojo es el principal transmisor del tifus. Recibió el premio Nobel de Medicina o Fisiología en 1928 por “su trabajo sobre el tifus”.
1910	Paul Ehrlich (1854-1915)	Desarrolló diversos métodos de tinción selectivos para diferentes tipos de células. En el campo de la quimioterapia, descubre el salvarsán al que llamó “bala mágica”, para el tratamiento de la sífilis. En 1908 compartió el Premio Nobel de Fisiología o Medicina con Ilya Mechnikov por el “reconocimiento a su trabajo en el terreno de la inmunidad” [68].
1913	Charles Robert Richet (1850-1935)	En 1890, tras demostrar que la sangre de animales vacunados protege de la infección, realizó la primera inyección seroterapéutica en el hombre para tratar la tuberculosis. En 1902 acuñó el término <i>anafilaxia</i> , para designar la sensibilidad desarrollada por un organismo después de recibir una inyección parenteral de una toxina. En 1913 recibió el premio Nobel en Fisiología o Medicina “en reconocimiento por su trabajo sobre anafilaxia”.
1913	Bella Schick (1877-1967)	Desarrolló un test cutáneo para determinar la susceptibilidad a la difteria. El test <i>Schick</i> que implica una inyección intradérmica de una pequeña cantidad de toxina, que se combina con antitoxina para causar una reacción inflamatoria localizada.
1918	Robert Earle Buchanan (1883-1973)	Publicó el primer análisis detallado del crecimiento de bacterias en cultivo [69]. Describe una curva de crecimiento generalizada que consta de 7 fases: inicial-estacionaria, latencia o crecimiento con aceleración positiva, logarítmica, aceleración de crecimiento negativa, estacionaria máxima, velocidad de muerte acelerada y fase de muerte logarítmica. Para cada fase de la curva realiza un detallado análisis matemático.
1922-1929	Alexander Fleming (1881-1955)	Descubrió la enzima antimicrobiana lisozima en 1922 [70] y, en 1929, un producto natural con efectos antibacterianos, la penicilina [71]. La penicilina la obtuvo a partir del hongo <i>Penicillium notatum</i> renombrado como <i>Penicillium chrysogenum</i> . En 1945 recibe el premio Nobel de Medicina o Fisiología junto a Ernst Boris Chain (1906-1979) y Sir Howard Walter Florey (1898-1968) por “el descubrimiento de la penicilina y su efecto curativo en varias enfermedades infecciosas”.
1928	Frederick Griffith (1879-1941)	Empleando distintas cepas del neumococo <i>Streptococcus pneumoniae</i> , demostró que las bacterias eran capaces de transferir información genética mediante un proceso denominado transformación. A dicha información la denominó “principio transformante” (posteriormente DNA).
1936	Gerhard Domagk (1895-1964)	Descubrió la sulfonamida prontosil, primer agente quimioterapéutico contra las infecciones bacterianas causadas por estreptococos, de la que derivaron las sulfamidas o drogas sulfa. Recibe el premio Nobel de Medicina o Fisiología en 1939 por “el descubrimiento de los efectos antibacterianos del prontosil”.
1937	Edouard Chatton (1883-1947)	Estableció una distinción entre organismos eucariontes (células con núcleo) y procariotes (anucleados). En una publicación de 1925 acuñó estos dos términos por primera vez.
1943	Max Delbrück (1906-1981) y Salvador E. Luria (1912-1991)	Comenzaron a estudiar los virus bacteriófagos. En 1943 ambos investigadores determinan que la mutación genética es la responsable de las resistencias bacterianas. Recibieron el premio Nobel de Medicina o Fisiología en 1969 junto a Alfred D. Hershey por “sus descubrimientos acerca del mecanismo de la replicación y estructura genética de virus”. (ver Tabla V).

Año*	Investigador	Descubrimiento
1943	Selman Waksman (1888-1973) y Albert Schatz (1922-2005)	Schatz aisló dos cepas de <i>actinobacteria</i> , que podían detener el crecimiento de ciertas bacterias resistentes a la penicilina. Waksman y él descubrieron la estreptomicina a partir de un cultivo de <i>Streptomyces griseus</i> , antibiótico usado para el tratamiento de la tuberculosis y otras enfermedades [72]. Waksman recibió el Premio Nobel de Medicina o Fisiología en 1952 por “el descubrimiento de la estreptomicina, el primer antibiótico efectivo contra la tuberculosis”.
1944	Oswald Theodore Avery (1877-1955), Colin MacLeod (1909-1972) y Maclyn McCarty (1911-2005)	Intentaron identificar el “principio transformante” de Griffith, demostrando que el DNA (ácido desoxirribonucleico) es el material genético que transporta la información durante la transformación.
1946	Joshua Lederberg (1925-2008)	Junto con Edward Lawrie Tatum (1909-1975) demostraron la existencia de conjugación en <i>Escherichia coli</i> . En 1952 con Norton Zinder (1928- ) descubren, con experimentos realizados con la enterobacteria <i>Salmonella</i> , que los bacteriófagos pueden portar genes de una bacteria a otra. A este proceso le denominaron transducción. En 1952 introduce el concepto de plásmido para definir partículas genéticas extracromosomales. En 1958 recibió el premio Nobel de Medicina o Fisiología “por sus descubrimientos en relación a la recombinación genética y la organización del material genético en bacterias”. Compartió dicho premio con George Wells Beadle (1903-1989) y Edward Tatum, a los que se les concedió por “el descubrimiento de que los genes actúan regulando eventos químicos definidos”.
1951	Barbara McClintock (1902-1992)	Descubrió el proceso de transposición de elementos del genoma (transposones) y explicó cómo los genes determinan ciertas características físicas. Estudió la respuesta del genoma al estrés o eventos traumáticos, como una infección viral, tras la que se activan potenciales transposones. Recibió el Premio Nobel de Medicina o Fisiología en 1983 “por sus descubrimientos sobre los elementos genéticos móviles”.
1952	Alfred Day Hershey (1908-1997) y Martha Chase (1927-2003)	Demostraron con el denominado experimento Hershey-Chase que el DNA era el material genético de algunos virus y que los bacteriófagos introducen DNA en las células huésped.
1953	Frits Zernike (1888-1966)	Desarrolló el microscopio de contrastes de fases, que permite visualizar a células vivas. Se le otorgó el premio Nobel de Física en 1953 por “su demostración del método de contraste de fases, especialmente por su invención del microscopio de contraste de fases”.
1955	François Jacob (1920 - ) y Élie Wollman (1917-2008)	Estudiaron la naturaleza de las relaciones entre el profago y el material genético de la bacteria. Su estudio les condujo a la definición del mecanismo de conjugación bacteriana, posibilitando el estudio genético de la bacteria. Acuñan el término “episoma” para describir elementos genéticos como el factor F (plásmido de <i>E. coli</i> ) que puede integrarse o no en el cromosoma bacteriano.
1959	Arthur Pardee (1921- ), François Jacob (1920 - ) y Jacques Monod (1910-1976)	Experimento “PaJaMo” donde estudiaron mediante procesos de conjugación bacteriana el control genético y la inducibilidad de la síntesis citoplásmica de la enzima $\beta$ -galactosidasa, implicada en el metabolismo de la lactosa [73].

Año*	Investigador	Descubrimiento
1960	François Jacob (1920 - ) y Jacques Monod (1910-1976)	Proponen el modelo del operón, primer ejemplo de la regulación de la expresión génica en procariotas [74]. En 1965 se les otorgó, junto a André M. Lwoff (1902-1994), el premio Nobel de Medicina o Fisiología por “sus descubrimientos sobre el control genético de la síntesis de enzimas y virus”.
1961-1966	Marshall Warren Nirenberg (1927-2010) y Har Gobind Khorana (1922- )	Trabajaron en la elucidación del código genético. Compartieron en 1968 el premio Nobel de Medicina o Fisiología con Robert W. Holley (1922-1993) por “su interpretación del código genético y su función en la síntesis de proteínas”.
1967	Thomas Dale Brock (1926- )	Descubrimiento de bacterias termófilas capaces de crecer a altas temperaturas. En 1969, junto con Hudson Freeze aisló la bacteria <i>Thermus aquaticus</i> [75]. Ésta es la fuente de diversas enzimas, entre ellas la Taq polimerasa, una DNA polimerasa utilizada en la PCR (no se requiere añadir enzima después de cada ciclo de desnaturación térmica del DNA). En 1989 la revista <i>Science</i> nombró a la Taq polimerasa la “molécula del año”. Para su comercialización la enzima se ha modificado y se utiliza un fragmento de menor tamaño denominado “ <i>Stoffel</i> ”.
1970	Werner Arber (1929- ), Daniel Nathans (1928-1999) y Hamilton Othanel Smith (1931- )	Descubrimiento de las endonucleasas de restricción, herramientas esenciales para el desarrollo de la Ingeniería Genética y otras Ciencias. Recibieron el premio Nobel de Medicina o Fisiología en 1978 por “el descubrimiento de las enzimas de restricción y su aplicación a problemas de Genética Molecular”.
1973	Bruce Ames (1928- )	Describe un ensayo biológico (test de Ames) para estimar el potencial mutagénico y/o carcinogénico de compuestos químicos [76].
1977	Carl Woese (1928- ) y George Edward Fox (1945- )	C. Woese crea una nueva taxonomía molecular fundamentada en la comparación entre especies de las secuencias de los RNA ribosomales 16S y 18S. En 1990 proponen un nuevo taxón de mayor rango, denominado “dominio”, clasificando a los seres vivos en tres dominios: <i>Bacteria</i> , <i>Eukaryay</i> y <i>Archaea</i> .
1979	Compañías Lilly y Genentech	Síntesis de la insulina por técnicas de DNA recombinante usando <i>E. Coli</i> .
1979-1984	Barry J. Marshall (1951-) y J. Robin Warren (1937- )	Aislamiento y cultivo de <i>Helicobacter pylori</i> a partir de mucosas de estómago humanas [77]. Afirman que la mayoría de las úlceras estomacales y gastritis estaban causadas por la colonización de esta bacteria. Reciben el premio Nobel de Medicina o Fisiología en 2005 por “el descubrimiento de la bacteria <i>Helicobacter pylori</i> y su papel en la gastritis y úlceras pépticas”.
1982	Karl Otto Stetter (1941- )	Aislamiento y caracterización de microorganismos <i>Archaea</i> que crecen a temperaturas superiores a los 80°C; en 2002 describe a <i>Nanoarchaeum equitans</i> que tiene el genoma más pequeño de los descritos.
1984	Kary Banks Mullis (1944- )	Inventa el método de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que supuso una revolución en la investigación biológica y médica [78]. El premio Nobel de Química de 1993 se otorgó por “las contribuciones al desarrollo de métodos en la química basada en el DNA”. K. Mullis lo recibió por “su invención del método de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)”; lo compartió con Michael Smith (1932-2000) por “sus contribuciones fundamentales al establecimiento de la mutagénesis dirigida mediante el empleo de oligonucleótidos y su desarrollo para el estudio de proteínas”.

Año*	Investigador	Descubrimiento
1989	Mehdi S. Ferdows y Alan G. Barbour	Descubrimiento de un cromosoma lineal en la espiroqueta <i>Borrelia burgdorferi</i> causante de la enfermedad de Lyme [79].
1991	Kendall D. Clements y Stanley Bullivant	Descubrieron <i>Epulopiscium fishelsoni</i> , la mayor célula procariota conocida hasta esa fecha y que inicialmente se había clasificado como protista por su gran tamaño.
1995	John Craig Venter (1946- ) y Hamilton Othanel Smith (1931- )	Descifraron por primera vez la secuencia completa del genoma de un organismo vivo, de la bacteria <i>Haemophilus influenzae</i> [80]. En 2007 J.C. Venter anunció la creación de un cromosoma artificial a partir de elementos químicos.
1996	André Goffeau (coordinador del proyecto)	Secuenciación de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (12,5 Mb), el primer eucarionte cuyo genoma fue secuenciado en su totalidad [81].
1997	Frederick R. Blattner, Guy Plunkett y colaboradores	Secuenciación completa del genoma de <i>Escherichia coli</i> K-12 [82].
1999	Heide N. Schulz y colaboradores	Descubrimiento de <i>Thiomargarita namibiensis</i> , la bacteria más grande descubierta hasta la fecha [51].

#### SIGLO XXI

2000	John F. Heidelberg y colaboradores	Determinan la secuencia de los dos cromosomas circulares en <i>Vibrio cholerae</i> . La mayoría de los genes esenciales para diferentes funciones celulares y la patogenicidad están localizados en el cromosoma mayor [83].
2002	David A. Hopwood, Stephen D. Bentley y colaboradores	Realizaron la secuenciación del genoma de <i>Streptomyces coelicolor</i> A3 (2), bacteria responsable de la producción de varios antibióticos [84].
2003	Haruo Ikeda, Masahira Hattori y colaboradores	Secuenciación del genoma completo de <i>Streptomyces avermitilis</i> , de interés farmacéutico ya que sintetiza metabolitos bioactivos secundarios [85].
2004	Minchen Chien y colaboradores	Secuenciación del genoma de <i>Legionella pneumophila</i> , el microorganismo productor de la enfermedad de los legionarios [86].
2007	Markiyan Oliynyk y colaboradores	Secuenciación del genoma de <i>Saccharopolyspora erythraea</i> , el microorganismo que se utiliza a escala industrial para la producción del antibiótico eritromicina A [87].
2009	Jaydip Ghosh y colaboradores	Describen el proceso de esporulación en <i>Mycobacterium</i> , su capacidad para persistir por largos períodos de tiempo en la célula infectada de forma asintomática y volver a su estado virulento [88].
2009	Venkatraman Ramakrishnan (1952-), Thomas A. Steitz (1940) y Ada E. Yonath (1939-)	Estudian el ribosoma a nivel atómico como diana para nuevos antibióticos. Han publicado estructuras con diferentes antibióticos unidos al ribosoma. Recibieron el premio Nobel de Química de 2009 por “los estudios de la estructura y función del ribosoma” [89-91].

(\*) El año indicado puede hacer referencia a la fecha del descubrimiento, al año de publicación de los resultados, o bien a la concesión del premio Nobel.

(Ivanovsky, Beijerinck) constataron la implicación de los microorganismos como agentes causantes de las enfermedades. También en ese siglo se empiezan a desarrollar diferentes métodos bacteriológicos.

Del siglo XIX vamos a seleccionar dos estudios, los realizados por Heinrich Hermann Robert Koch y los relacionados con la bacteria *Helicobacter pylori*. Uno de los primeros hallazgos de Koch fue el del bacilo de ántrax, agente causante del carbunclo. Es una enfermedad infecciosa aguda causada por la bacteria *Bacillus anthracis*, una bacteria gram-positiva, aerobia que forma esporas. La bacteria fue identificada en 1850 en dos estudios independientes, por Aloys Pollender (1800-1879) en Alemania y por Pierre François Olive Rayer (1793-1867) y Casimir Davaine (1812-1882) en Francia. Sin embargo, fue Koch, en 1877, quien estableció la etiología de la enfermedad y describió la capacidad de la bacteria para formar esporas (esporulación), las cuales pueden permanecer durante largos períodos inactivas y ser nuevas fuentes de infección [62]. También establece la relación entre una enfermedad y una bacteria específica, el bacilo de la tuberculosis (*Bacillus anthracis* o bacilo de Koch) y el bacilo del cólera (*Vibrio cholerae*) [63, 64].

Con respecto al segundo grupo de estudios, hay que mencionar que *H.pylori* es una bacteria espiral que infecta el epitelio del estómago. Durante mucho tiempo las gastritis y las úlceras de estómago se asociaron al estrés, ingestión de comida picante, etc., y se trataban con productos anti-ácido. Sin embargo, hoy es aceptado que muchos de estos síntomas se deben a infecciones por *H. pylori*. En muchos casos, los sujetos infectados nunca desarrollan síntomas. A lo largo del siglo XIX se pueden reseñar tres hechos relevantes relacionados con esta bacteria. En 1875, científicos alemanes observaron bacterias espirales en el epitelio del estómago humano. En 1892, Giulio Bizzozero (1846-1901) describió una serie de bacterias espirales que vivían en el ambiente ácido del estómago de perros. En 1899, Walery Jaworski (1849-1924) describe una bacteria que vive en el estómago humano a la que llama *Vibrio rugula*, siendo el primero en sugerir la participación de este microorganismo en enfermedades gástricas. Al publicar sus resultados en un libro en polaco (*Podręcznik chorób żołądku*, Manual de enfermedades gástricas), el descubrimiento no tuvo difusión [67]. Ya en el siglo XX, el patólogo

australiano Robin Warren redescubre la bacteria en 1979 y, posteriormente, junto a Barry Marshall, la aislaron y cultivaron a partir de las mucosas de estómagos humanos [77]. En su trabajo publicado en 1984, Warren y Marshall proponen que muchas de las úlceras estomacales y gastritis están causadas por esta bacteria. Marshall y Warren posteriormente describieron que los antibióticos son efectivos para el tratamiento de la gastritis. En 2005, Warren y Marshall fueron galardonados con el Premio Nobel de Medicina por sus trabajos acerca de *H. pylori*.

Los antibióticos, así como su uso como agentes terapéuticos para el tratamiento de enfermedades bacterianas como la tuberculosis, peste bubónica, la lepra u otras, no se aislaron e identificaron hasta el siglo XX. En la primera década de dicho siglo, Paul Ehrlich desarrolla diversos métodos de tinción selectivos para diferentes tipos de células. En el campo de la quimioterapia, descubre el salvarsán cuya acción selectiva frente a las espiroquetas permitió su uso para el tratamiento de la sífilis. Así, se abrió el paso a la utilización terapéutica de los antibióticos que se irían descubriendo a lo largo del siglo. El salvarsán fue el único tratamiento eficaz contra la sífilis hasta la purificación de la penicilina en los años cuarenta.

En 1909, P. Laschtschenko, profesor de la Universidad de Tomsk (Rusia), observó que la clara de huevo era capaz de lisar cultivos de *Bacillus subtilis*, y que esta propiedad desaparecía al calentarla [93]. Sin embargo, no fue hasta 1922 cuando el microbiólogo Sir Alexander Fleming describió la lisozima, una proteína antimicrobiana que se encuentra en secreciones corporales, como la saliva y las lágrimas, y en la clara del huevo [70]. El descubrimiento de la penicilina, arquetipo de los antibióticos, constituyó una adquisición clave de la terapéutica moderna. Aunque el descubrimiento se atribuye a Fleming, las propiedades curativas de ciertos "mohos" eran ya conocidas desde tiempos muy antiguos. En 1870, Sir John Scott Burdon-Sanderson (1828-1905) describió que los cultivos bacterianos cubiertos por mohos impedían el crecimiento bacteriano, estudios que fueron continuados por Joseph Lister y por John Tyndall, todos ellos en Inglaterra. En 1897, Ernest Duchesne (1874-1912) en su Tesis Doctoral describió la actividad antibiótica de hongos *Penicillium* y su capacidad para curar cobayas infectadas con bacilos del tifus, pero no

pensó que fuera debido a una sustancia liberada por el hongo [94]; además, no se trataba de *Penicillium notatum* ya que la penicilina no es capaz de combatir las fiebres tifoideas. Remitió dicha Tesis al Instituto Pasteur, pero le ignoraron por su juventud. Posteriormente, en 1923, el médico costarricense Clodomiro Picado Twilight, investigador del Instituto Pasteur, volvió a describir los efectos antibacterianos del *Penicillium*. El descubrimiento de Fleming tuvo su origen en un hecho casual. En 1928, Fleming estaba trabajando con un cultivo bacteriano de *Staphylococcus aureus* que se contaminó accidentalmente con el hongo *Penicillium notatum* y observó que alrededor de este hongo se formaba un halo sin bacterias. El hongo producía “algo” capaz de matar a las bacterias y terminó purificando dicho compuesto al que bautizó como penicilina (bencilpenicilina o penicilina G) [71], primer antibiótico del grupo de los  $\beta$ -lactámicos. Este antibiótico revolucionó el tratamiento de las infecciones bacterianas como la neumonía, la sífilis, la tuberculosis y la gangrena. Entre 1938 y 1940 Ernst Boris Chain y Howard Walter Florey desarrollan métodos para el análisis y ensayo de penicilina. Diseñaron un protocolo para el aislamiento de la penicilina para su producción industrial y comercialización en 1942. Por el descubrimiento de la penicilina y su efecto curativo en varias enfermedades infecciosas Fleming compartió en 1945 el Premio Nobel de Fisiología o Medicina con Florey y Chain. Aunque el primer antibiótico natural utilizado fue la tirotricina, un polipéptido cíclico aislado por René Dubois (1901-1982) en 1939 a partir *Bacillus brevis*, éste sólo se utiliza de forma tópica dada su toxicidad.

La penicilina fue el primer antibiótico natural que se descubrió, pero las sulfamidas son anteriores. La primera de ellas fue el prontosil, p-((2,4-diaminofenil)azo)bencenosulfonamida, sintetizada por Paul Gelmo en 1908 y que se comercializó 1932. El prontosil fue el primer fármaco de síntesis con acción bactericida amplia. Gerhard Johannes Paul Domagk, médico bacteriólogo que trabajaba en IG Farben, descubrió que el colorante rojo prontosil *rubrum* era efectivo contra las infecciones causadas por estreptococos y estafilococos; trató a su propia hija con él, evitando la amputación de uno de sus brazos. Por el descubrimiento de los efectos antibacterianos del prontosil Domagk recibió el premio Nobel de Fisiología o Medicina en 1939. El prontosil se comporta como una

prodroga que se metaboliza en el organismo para convertirse en sulfanilamida (p-aminofenilsulfonamida).

El segundo antibiótico natural, la estreptomicina, fue descubierta en 1943 por Albert Schatz en el laboratorio de Selman Abraham Waksman, y está clasificada dentro del grupo de los aminoglucósidos [72]. Está producida por actinomicetos, y resultó efectiva para el tratamiento de la tuberculosis. Además, Waksman y sus colaboradores aislaron alrededor de otros 20 antibióticos pero algunos de ellos resultaron excesivamente tóxicos para su utilización en humanos: actinomicina (1940), clavacina y estreptotricina (1942), griseína (1946), neomicina (1949) [95]. Estreptomicina y neomicina tienen aplicaciones en numerosas infecciones. Waksman recibió el premio Nobel en Fisiología y Medicina 1952 “por su descubrimiento de la estreptomicina, el primer antibiótico efectivo contra la tuberculosis”. Posteriormente se fueron descubriendo otros antibióticos, como la cloromicetina o cloranfenicol (1947; John Ehrlich y Paul R. Burkholder), las tetraciclinas (1948; Benjamin M. Duggar) [96], las cefalosporinas (1951; H.S. Burton y Edward P. Abraham) [97] la eritromicina o Iloticina (1952; J.M. McGuire) [98], la kanamicina (1957; Ken Yanagisawa y Naoyuki Sato) [99], la gentamicina y el ácido nalidíxico (1963) y muchos otros.

## ANTIBIÓTICO

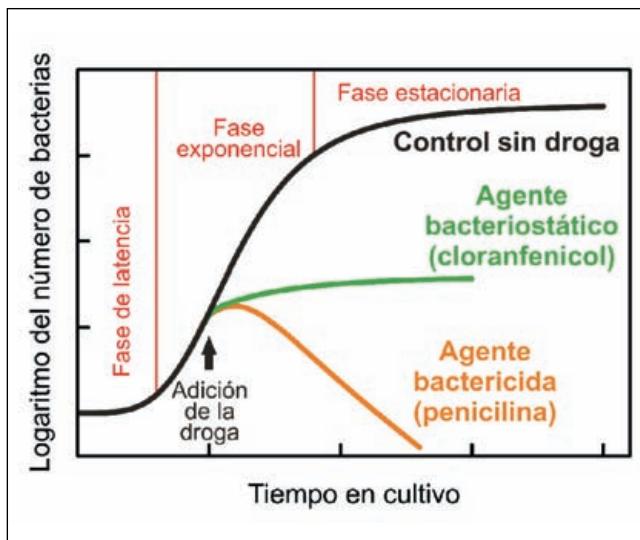
El término antibiótico, del griego “ $\alpha\tau\tau\iota - anti$ ” (en contra) y “ $\beta\iota\otimes\tau\iota\kappa\zeta - biotikos$ ” (dado a la vida), fue propuesto en 1942 por Selman A. Waksman, descubridor de la estreptomicina y considerado el padre de los antibióticos. Los define como “aquellas sustancias químicas producidas por microorganismos que, a bajas concentraciones, inhiben el desarrollo o destruyen la vida de otros microorganismos”. Esta definición, que hace referencia a los antibióticos naturales, como la penicilina, se amplió para incluir a moléculas con actividad similar pero que son sintéticas (obtenidas por síntesis química, como por ejemplo las sulfamidas) o semi-sintéticas (obtenidas a partir de cultivos microbianos y, posteriormente, sometidas a una modificación química, como la ampicilina). En términos estrictos, un antibiótico es una sustancia secretada por un microorganismo, u obtenida por síntesis química, que tiene la capacidad de afectar a otros

microorganismos. Por ello, los antibióticos no son efectivos frente a las enfermedades víricas. En el Vocabulario Científico y Técnico de la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, se recoge la definición de antibiótico atendiendo a los mecanismos moleculares de actuación: “Sustancia biosintetizada por diferentes organismos capaz de inhibir el desarrollo de otras células, procarióticas o eucarióticas, con arreglo a variados mecanismos moleculares, tales como replicación, transcripción del DNA, traducción del mRNA, síntesis de péptidoglicanos, etc.” [100]. El concepto de *antibiosis* (“frente a la vida”) se acuñó en 1877 cuando Pasteur y Koch observaron que un bacilo en el aire podía inhibir el crecimiento de la bacteria *Bacillus anthracis*. Se define como la asociación antagonista entre organismos en detrimento de uno de ellos, por no soportar las sustancias tóxicas que se segregan el otro; se aplica a la relación entre un antibiótico y un organismo infeccioso.

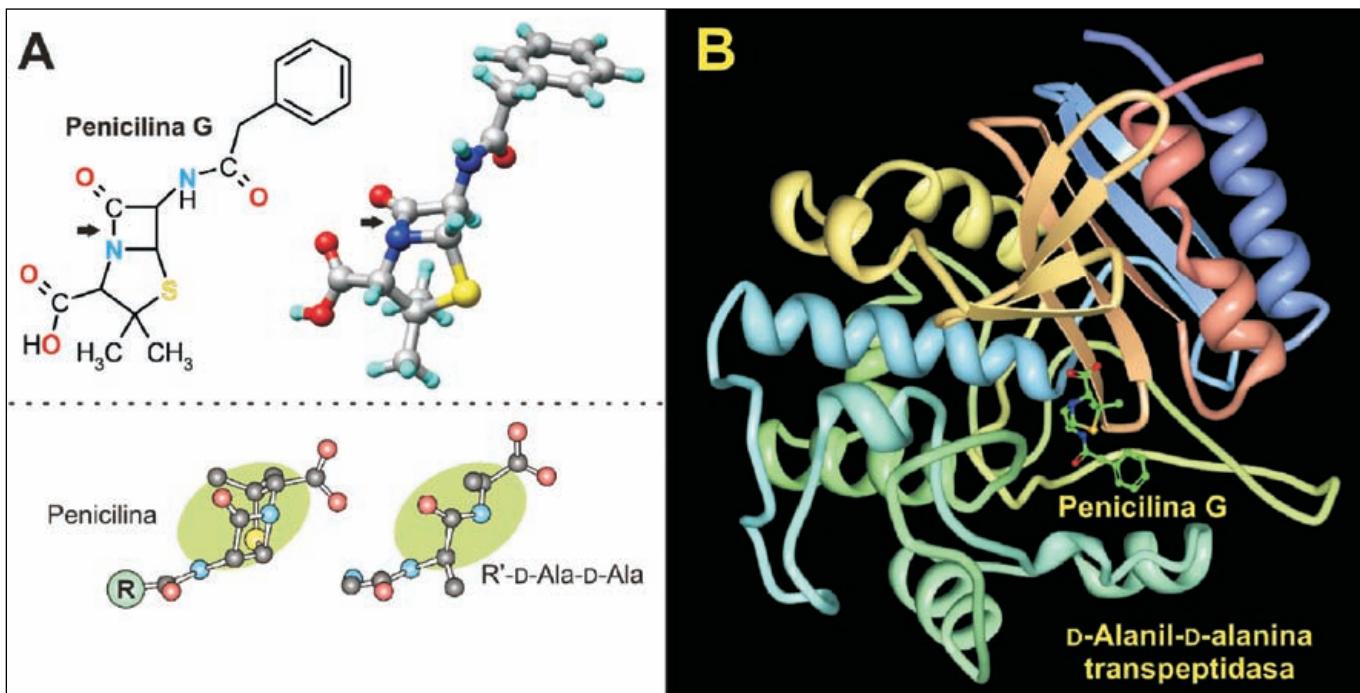
Hay diferentes grupos de microorganismos productores de antibióticos. ¿Por qué un microorganismo

produce un antibiótico? Aunque los antibióticos no son esenciales para el crecimiento del microorganismo que los produce, la síntesis de estos productos secundarios les proporciona ventajas para sobrevivir en ambientes competitivos. Por ejemplo, la producción de antibióticos durante el proceso de esporulación, en condiciones limitantes de nutrientes, garantizaría la no proliferación y competencia con otros microorganismos. Los hongos filamentosos producen alrededor del 25% de los antibióticos naturales conocidos [de los géneros *Penicillium* (penicilina), *Cephalosporium* (cefalosporinas) y *Aspergillus* (penicilina y otros)]. Las bacterias producen el 75% restante de los antibióticos. Así, los actinomicetos (bacterias gram-positivas), del género *Streptomycetaceae*, los *Streptomyces*, producen el mayor número de antibióticos, tanto bactericidas como fungicidas. Hasta 1997 se habían aislado alrededor de 3.000 compuestos de los cuales casi el 10% podrían ser de utilidad en medicina humana, veterinaria y agricultura [101]; algunos ejemplos son las tetraciclinas, la eritromicina o la estreptomicina. De la familia *Bacillaceae* (también bacterias gram-positivas), *Bacillus subtilis* produce bacitracina y muchos otros mayoritariamente de naturaleza peptídica [102] y *Bacillus polymyxa* sintetiza polimixina.

Los antibióticos pueden actuar como agentes bactericidas, produciendo la muerte de las bacterias, o pueden funcionar como agentes bacteriostáticos, inhibiendo su crecimiento y multiplicación para ser posteriormente eliminadas por los sistemas de defensa de nuestro organismo. Estos efectos dependen de la concentración del antibiótico en el sitio de la infección, del tipo de bacterias sobre las que actúan, de la fase de crecimiento en la que se encuentran las bacterias y de la densidad de la población bacteriana. En la Figura 5 se muestra una curva de crecimiento de un cultivo bacteriano en medio líquido que, tras una fase de latencia en la que no se modifica el número de células, las células proliferan durante la fase exponencial. El crecimiento logarítmico se reduce y se inicia la fase estacionaria; si los nutrientes se agotan o se acumulan sustancias que pueden ser tóxicas, el cultivo entra en la fase de muerte (no mostrada en la figura). Si se añade al cultivo un agente bacteriostático, como el cloranfenicol, la división celular se detiene y, al no proliferar, el número de células se mantiene constante. Si se añade un agente bactericida, como la penicilina, se produce la muerte de las bacterias con la consiguiente disminución del número de células.



**Figura 5. Curva de crecimiento de un cultivo de bacterias.** En un cultivo de bacterias, tras una fase de latencia o adaptación a las condiciones de cultivo (no se modifica el número de células), las células proliferan durante la fase exponencial; el crecimiento se reduce y mantiene en la fase estacionaria. Si los nutrientes se agotan o se acumulan sustancias que pueden ser tóxicas, el número de células se reduce, el cultivo entra en la fase de muerte (no mostrada en la figura). Si se añade al cultivo un agente bacteriostático, como el cloranfenicol, la división celular se detiene y, al no proliferar, el número de células se mantiene constante. Si se añade un agente bactericida, como la penicilina, se produce la muerte de las bacterias con la consiguiente disminución del número de células.

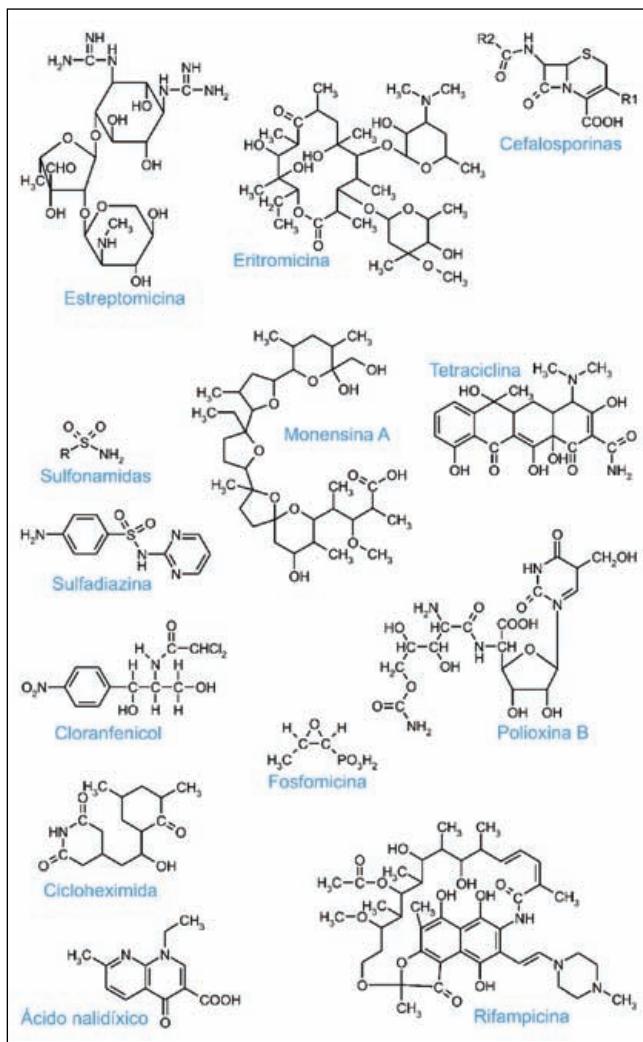


**Figura 6. Estructura de la bencilpenicilina.** (A) Estructura de la penicilina G derivada del ácido 6-aminopenicilánico mostrando (con una flecha) el enlace del anillo  $\beta$ -lactámico de la molécula que es reconocido por la transpeptidasa. En la parte inferior se muestra la analogía estructural de la penicilina y de la parte final de la cadena peptídica ( $R$ -D-Ala-D-Ala) del péptidoglicano de bacterias gram-negativas, región reconocida por la transpeptidasa para formar los enlaces de entrecruzamiento. (B) Estructura del complejo de la penicilina G unida a la D-alanil-D-alanina transpeptidasa de *Streptomyces R61* [103]. La figura se ha creado a partir del fichero PDB 1PWC del Protein Data Bank utilizando el programa ProteinWorkshop v3.7 [104].

Los antibióticos del grupo de los  $\beta$ -lactámicos, como la penicilina, son derivados del ácido 6-aminopenicilánico, difiriendo entre sí según la sustitución en la cadena lateral de su grupo amino. Existe una gran diversidad de penicilinas que difieren químicamente entre sí en función de la cadena lateral anclada al grupo amino del ácido 6-aminopenicilánico y según su espectro de acción. Por ejemplo, la bencilpenicilina es eficaz contra bacterias gram-positivas como estreptococos y estafilococos. Se administra por vía parenteral debido a su sensibilidad al pH ácido del estómago. Sin embargo, otras penicilinas resisten el pH ácido, como la fenoximetilpenicilina sintética (penicilina V), que puede administrarse por vía oral, o la ampicilina, que es activa contra bacterias gram-negativas como *Haemophilus*, *Salmonella* y *Shigella*. Para mejorar la efectividad de un antibiótico, y en algunos casos rebajar su potencial toxicidad, se han ido describiendo bien nuevas formulaciones del mismo o bien nuevos antibióticos. La aparición de resistencias frente a antibióticos también ha impulsado la elaboración de nuevas moléculas o cambios en las preexistentes, como ha ocurrido en el caso de los  $\beta$ -

lactámicos. En este contexto se encontrarían las cefalosporinas de 4<sup>a</sup> generación (p.e., cefepima y cefpiroma), que no sólo tienen un mayor espectro de actuación que las anteriores, sino que también son más resistentes a la acción de las  $\beta$ -lactamasas.

Como ya se ha comentado, por la analogía del enlace del anillo  $\beta$ -lactámico de la penicilina con la región del enlace D-Ala-D-Ala terminal de la cadena pentapeptídica del péptidoglicano, las penicilinas funcionan como inhibidores del proceso de transpeptidación interfiriendo en la formación del péptidoglicano. De esta forma, la penicilina provoca la formación de una pared bacteriana débil, lo que favorece la lisis osmótica de la bacteria durante el proceso de multiplicación o su fagocitación. En la Figura 6 se compara la estructura del núcleo de una penicilina y su analogía con la región D-Ala-D-Ala del péptidoglicano. Además, los análisis cristalográficos han permitido analizar los complejos acil-enzima y antibióticos  $\beta$ -lactámicos; una de estas estructuras, la del complejo de la penicilina G unida a la D-alanil-D-alanina transpeptidasa de *Streptomyces R61* [código



**Figura 7. Estructuras de diferentes fármacos antibacterianos.** Se recogen las fórmulas de un antibiótico representativo de cada uno de los subgrupos de antibióticos: que contienen hidratos de carbono (estreptomicina), macrólidos (eritromicina),  $\beta$ -lactámicos (cefalosporinas), drogas sulfá (sulfonamidas y sulfadiazina), antibióticos poliéter (monensina A), quinonas (tetraciclina), derivados del benceno (cloranfenicol), que contienen fósforo (fosfomicina), nucleosídicos (polioxina B), derivados del cicloalcano (cicloheximida), quinilonas (ácido nalidíxico) y lactosas macrocíclicas (rifampicina).

del *Protein Data Bank* (PDB) 1PWC, [103]), se muestra en la Figura 6 representada utilizando el programa PDB ProteinWorkshop v3.7 [104].

Los antibióticos, para funcionar como agentes terapéuticos, deben cumplir una serie de propiedades. Una de ellas es la toxicidad selectiva o una toxicidad hacia los organismos invasores superior a la que el compuesto ejerce frente a los animales o seres humanos; de ella depende la dosis terapéutica a utilizar. Un

antibiótico debe interferir sólo sobre estructuras, enzimas o mecanismos presentes en bacterias, pero no en el huésped. Por ejemplo, el efecto de la penicilina sobre las células humanas es muy débil ya que estas carecen del péptidoglicano de la pared celular. La sensibilidad de los microorganismos a los antibióticos varía según el tipo considerado. Las bacterias gram-positivas son generalmente más sensibles que las gram-negativas. Cuando un antibiótico actúa eficazmente sobre ambas se dice que es de amplio espectro; si actúa sólo sobre un número reducido de patógenos se dice que es de espectro reducido. Ejemplos de antibióticos con un espectro de acción amplio, sobre bacterias gram-negativas y gram-positivas son el cloranfenicol, las tetraciclinas y las penicilinas de amplio espectro; de espectro intermedio, sobre gram-positivas, la penicilina G y la oxacilina; de bajo espectro, frente a cocos gram-positivos y bacilos gram-negativos, la vancomicina y la polimixina; de espectro selectivo, la nistatina que actúa casi exclusivamente sobre *Candida albicans*. Además, un antibiótico no debe inducir resistencia, debe ser estable en líquidos corporales (o se deberá utilizar sólo tópicamente) y su período de actividad debe ser largo; no debe ejercer efectos dañinos en el paciente ni generar una respuesta alérgica.

Los antibióticos se pueden clasificar teniendo en cuenta su estructura química o su mecanismo de acción. En función de su estructura química se describen diferentes grupos. Dentro de los bactericidas se encuentran los  $\beta$ -lactámicos (penicilinas y cefalosporinas), los glicopéptidos (vancomicina, teicoplanina), los aminoglucósidos (estreptomicinas), las quinolonas (norfloxacinos, ácido nalidíxico), lactonas macrocíclicas (rifampicina) y las polimixinas. Como bacteriostáticos actúan los macrólidos (eritromicinas), las tetraciclinas, las sulfamidas, el cloranfenicol, la fosfomicina, etc. En la Figura 7 se recogen las fórmulas de algunos antibióticos representativos de cada subgrupo.

## MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS ANTIBIÓTICOS

Los antibióticos, según su estructura química, actúan sobre diferentes dianas de la bacteria bloqueando procesos clave para su supervivencia. Para

### TABLA II: Mecanismo de acción de distintos antibióticos

#### **Inhibición de la síntesis de la pared celular** (contra bacterias gram-positivas)

**Penicilina, ampicilina, carbenicilina, meticilina, cefalosporinas** (análogos peptídicos  $\beta$ -lactámicos)

Inhiben a las enzimas de transpeptidización que participan en la formación de los enlaces entre las cadenas polisacáridas del peptidoglicano de la pared celular bacteriana. Activan a las enzimas líticas de la pared celular.

**Vancomicina** (C-glicósido)

Se une a la región D-Ala-D-Ala del tetrapéptido de las cadenas de glicanos por lo que inhibe la reacción de transpeptidización.

**Bacitracina** (polipéptido cíclico)

Interfiriene con la desfosforilación de una molécula que transporta precursores del peptidoglicano en la membrana celular bacteriana.

#### **Inhibición de la síntesis proteica**

**Estreptomicina, gentamicina** (aminoglicósidos)

Interaccionan con la subunidad 30S del ribosoma bacteriano inhibiendo la síntesis proteica y provocan una lectura errónea del RNA mensajero.

**Cloranfenicol** (derivado del benceno)

Interacciona con la subunidad 50S del ribosoma bacteriano; inhibe a la peptidiltransferasa bloqueando la formación del enlace peptídico.

**Tetraciclinas** (quinona compleja)

Se unen a la subunidad 30S del ribosoma e interfieren con la unión aminoacil-tRNA.

**Eritromicina y clindamicina** (macrólidos; lactonas macrocíclicas)

Se unen a la subunidad 50S del ribosoma e inhiben la translocación en la etapa la elongación de la cadena polipeptídica.

**Ácido fusídico** (naturaleza esteroídica)

Se une al factor de elongación EF-G bloqueando el proceso de la translocación.

#### **Inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos**

**Ciprofloxacino y otras quinolonas** (quinonas complejas)

Inhiben a la DNA girasa bacteriana interfiriendo en la replicación del DNA bacteriano y en la transcripción.

**Rifampicina** (lactona macrocíclica)

Bloquea la síntesis de RNA uniéndose e inhibiendo a la RNA polimerasa dependiente de DNA.

#### **Alteración de la membrana celular**

**Polimixina B** (polipéptido cíclico)

Se une a la membrana plasmática alterando su estructura y sus propiedades de permeabilidad.

#### **Antagonismo metabólico**

**Sulfamidas** (derivadas de la sulfonamida)

Inhiben la síntesis de ácido fólico compitiendo con el ácido-*p*-aminobenzoico.

**Trimetoprima** (derivado de pirimidina)

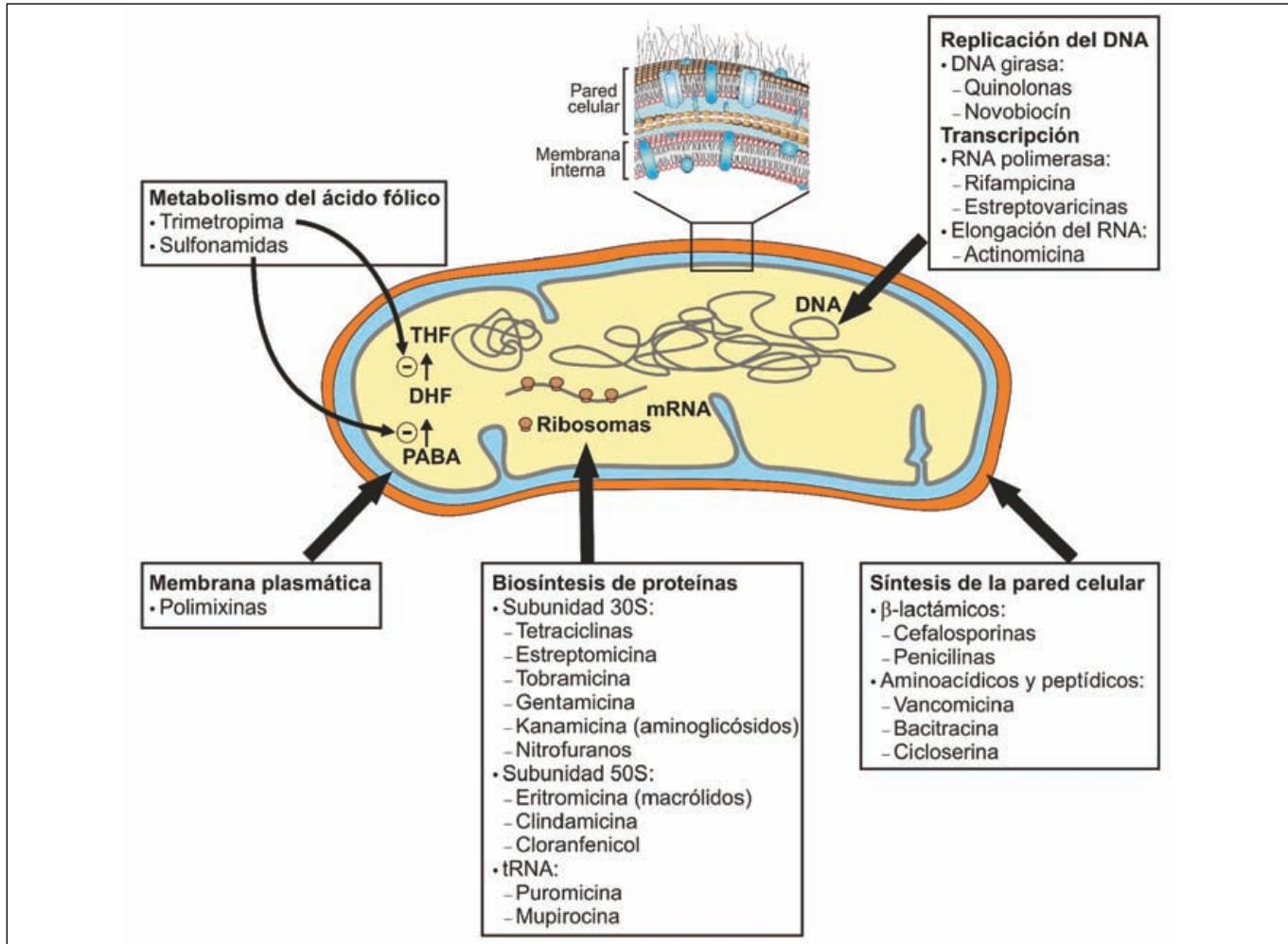
Antibiótico bacteriostático, inhibidor de la enzima dihidrofolato reductasa por lo que bloquea la síntesis del tetrahidrofolato.

**Dapsone** (derivado aromático de sulfona)

Antibiótico bacteriostático que inhibe la síntesis del ácido para-aminobenzoico

**Isoniazida** (derivado de piridina con un grupo hidracina)

Inhibe la síntesis del ácido micólico impidiendo la formación de la pared bacteriana.



**Figura 8.** Esquema de los diferentes mecanismos de acción de los antibióticos. Los antibióticos pueden actuar sobre los patógenos de diversa maneras: inhibición de la síntesis de la pared celular, inhibición de la biosíntesis de proteínas, alteración de la membrana celular, antagonismo metabólico e inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos. En cada caso se indican algunos ejemplos concretos de antibióticos cuyo mecanismo de acción transcurre por alguna de las vías mencionadas. [PABA: ácido p-aminobenzoico; DHF: ácido dihidrofólico y THF: ácido tetrahidrofólico].

que el fármaco no interfiera en las funciones de la célula huésped, éste tiene que actuar selectivamente sobre las bacterias, discriminando entre estructuras o moléculas de las células procariotas y las eucariotas. Los blancos más importantes son: la pared bacteriana, algunas enzimas que catalizan reacciones metabólicas, y los procesos de síntesis de ácidos nucleicos o de proteínas. Un esquema de los diferentes mecanismos de acción de los antibióticos, y algunos ejemplos concretos de antibióticos cuyo mecanismo de acción transcurre por alguna de las vías mencionadas, se muestra en la Figura 8 y se describen en la Tabla II. En ocasiones se procede a la administración de forma combinada de más de un antibiótico, cuyo mecanismo de acción puede ser diferente pero, en conjunto, se

produce una acción sinérgica, incrementando la efectividad del tratamiento.

**En la síntesis y ensamblaje de los componentes de la pared bacteriana** pueden interferir distintos tipos de antibióticos [52]. Las penicilinas, como ya se ha comentado anteriormente, inhiben la formación de la pared bacteriana en células en crecimiento que están biosintetizando el péptidoglicano; ello implica que, en último término, se activen las autolisinas con la siguiente muerte celular. Los glicopéptidos, como la vancomicina, se unen con una gran afinidad y especificidad a la región D-Ala-D-Ala de los precursores del péptidoglicano impidiendo el acceso a éste de las transglucosilasas y transpeptidáceas inhibiendo el

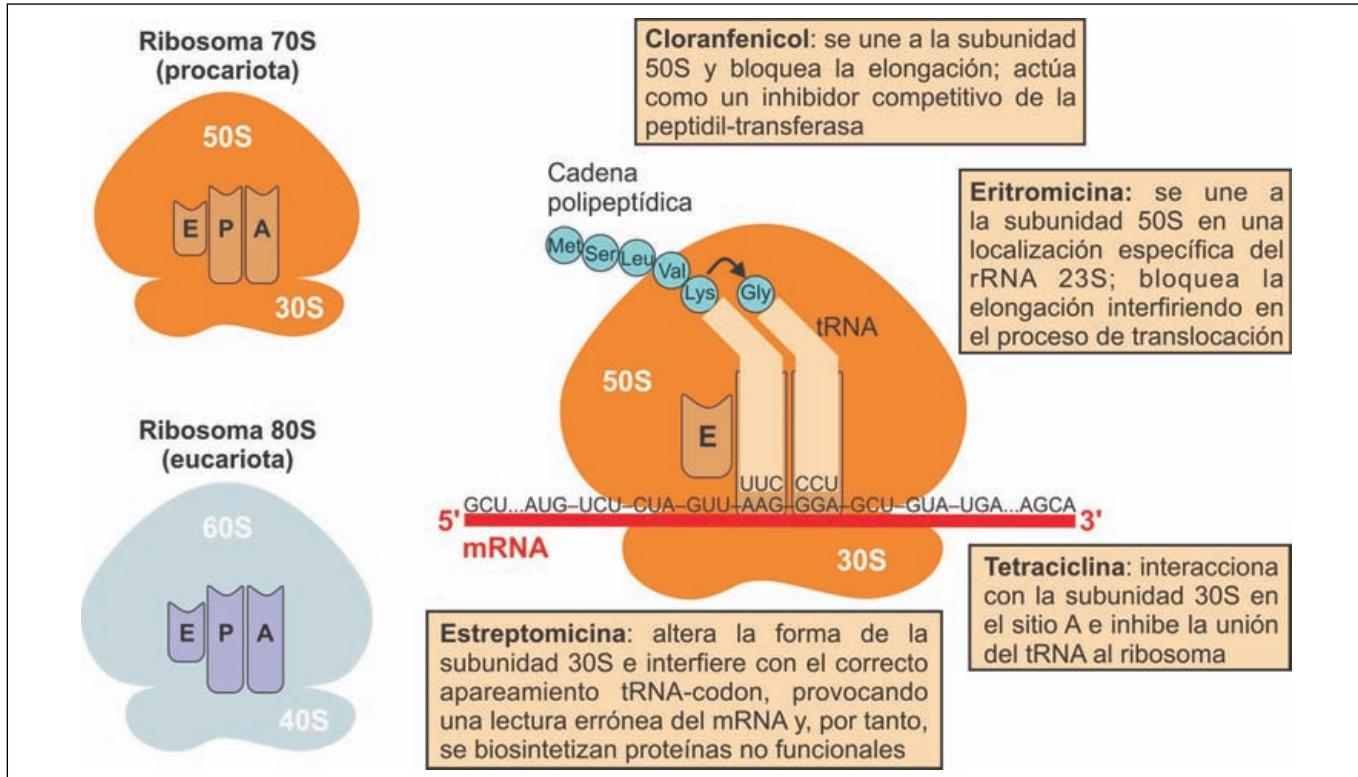
proceso de transglicosilación. Sobre la síntesis de precursores del péptidoglicano actúan la fosfomicina y la cicloserina. La fosfomicina inhibe la enzima murA que cataliza la transformación N-acetilglucosamina a N-acetilmurámico y, por tanto, afecta a la primera etapa de la síntesis del péptidoglicano. La cicloserina, un análogo estructural de la D-Ala, es un inhibidor competitivo de la racemasa (cataliza la transformación de L-Ala a D-Ala) y de la sintetasa o ligasa que cataliza la formación del dipéptido D-Ala-D-Ala. Por otro lado, la bacitracina [105], un antibiótico que se utiliza sólo por vía tópica, es un dodecapéptido cíclico que impide la desfosforilación del pirofosfato de C<sub>55</sub>-isoprenilo, molécula clave para la formación de la pared bacteriana ya que transporta los elementos estructurales del péptidoglicano [106].

**La membrana celular** también es el blanco de los antibióticos. Las polimixinas, como la colistina, son lipopéptidos catiónicos que actúan específicamente como detergentes en la membrana externa de las bacterias gram-negativas. Se insertan en la membrana exterior interaccionando con el lípido del lipopolisacárido a través del ácido graso de la polimixina [107]. El resultado es un aumento de la permeabilidad de la membrana externa y la muerte rápida de la bacteria. La daptomicina, también un lipopéptido pero aniónico, es activa sólo frente a las bacterias gram-positivas. Su mecanismo de acción supone la inserción del antibiótico en la membrana interna causando una despolarización de la misma y la pérdida de potencial de membrana, lo que conduce a la inhibición de la biosíntesis de proteínas, de DNA y de RNA, con el resultado final de la muerte celular.

Las sulfamidas y la trimetoprima interfieren en la **biosíntesis de los ácidos nucleicos**. Las sulfamidas están relacionadas estructuralmente con la sulfanilamida, que es un análogo estructural del ácido p-aminobenzoico. Esta molécula es precursora del ácido fólico (considerado factor de crecimiento), cofactor esencial para las bacterias porque participa en la biosíntesis de las bases nitrogenadas que constituyen los ácidos nucleicos. Las sulfamidas actúan como un falso sustrato de la enzima pteridina sintetasa (que cataliza la transformación ácido p-aminobenzoico a ácido dihidropteroico); compiten con el ácido fólico inhibiendo la biosíntesis de bases nitrogenadas lo que produce una paralización del crecimiento celular o la muerte del patógeno. El ácido dihidropteroico se con-

vierte en ácido dihidrofólico y éste, a su vez, en el ácido tetrahidrofólico por la acción de la enzima dihidrofolato reductasa; esta enzima es inhibida de forma específica por la trimetoprima. A la célula huésped, a nuestras células, no les afectan estos antibióticos ya que carecen de la ruta de biosíntesis de ácido fólico, que tiene que ser suministrado en la dieta.

Dos familias de antibióticos inhiben la biosíntesis de los ácidos nucleicos, las quinolonas y las rifamicinas (rifampicina y análogos). Sus dianas específicas son enzimas involucradas en la síntesis de ácidos nucleicos: la DNA girasa y la topoisomerasa IV. Éstas son topoisomerasas de tipo II que modulan el estado topológico del DNA; regulan su estructura superhelicoidal reduciendo la tensión molecular causada por el superenrollamiento del DNA. Para que el DNA pueda replicarse y transcribirse es necesario que su estructura superhelicoidal se relaje. Estas enzimas producen cortes en la cadena de DNA, lo desenrollan y, posteriormente, sellan la rotura. Las quinolonas bloquean la reparación del DNA una vez cortado, lo cual conlleva una serie de respuestas que determinan la degradación del genoma bacteriano. El resultado es la muerte rápida de la bacteria. La diana primaria de las diversas quinolonas depende del derivado en cuestión, del tipo de bacteria y de la actividad intrínseca de los distintos compuestos o afinidad por las dianas. Por lo general, en los bacilos gram-negativos la diana es la DNA girasa, mientras que en los cocos gram-positivos es la topoisomerasa IV. Por otro lado, las rifamicinas inhiben la transcripción del DNA a RNA; la rifampicina es uno de los antibióticos más potentes y de amplio espectro frente a patógenos bacterianos y es un componente clave en la terapia antituberculosa. La rifampicina interacciona con la subunidad β de la RNA polimerasa bacteriana dependiente de DNA. Se sitúa en el canal DNA/RNA, en una región desplazada 12 Å del centro catalítico. Este inhibidor actúa bloqueando la elongación del RNA cuando el tránskrito que ha comenzado a sintetizarse sólo tiene 2-3 nucleótidos [108]. La RNA polimerasa II de las células humanas no es sensible a las rifamicinas. La nitrofurantoína es un derivado del nitrofurano que puede actuar sobre la síntesis de proteínas o provocar, en su forma reducida, un daño en el DNA bacteriano. Una vez reducida en el interior de la bacteria por la nitrofurano reductasa, puede unirse a proteínas ribosómicas y bloquear la traducción o alterar el metabolismo.



**Figura 9.** Ribosomas procariotas y eucariotas, y biosíntesis de proteínas. En la parte izquierda de la figura se esquematizan los ribosomas 70S procariotas (subunidades 50S y 30S) y los ribosomas 80S eucariotas (subunidades 60S y 40S). El esquema de la derecha representa la fase de formación del enlace peptídico de la etapa de elongación de la cadena polipeptídica en crecimiento. Se indican algunos ejemplos de antibióticos que bloquean la biosíntesis de proteínas y su modo de actuación.

**La biosíntesis de proteínas** es el proceso sobre el que interfiern numerosos antibióticos; éstos interaccionan con distintas bases nitrogenadas de los RNA ribosómicos en el centro de descodificación (donde el anticodon del RNA de transferencia lee el triplete codificador del RNA mensajero), en el de formación de los enlaces peptídicos (peptidil-transferasa) o en el túnel de salida de la cadena polipeptídica recién sintetizada. Los antibióticos no afectan a los ribosomas citoplasmáticos de las células humanas (ribosomas 80S) ya que son diferentes a los ribosomas 70S procariotas; difieren en tipo de RNA y en las proteínas ribosomales que los constituyen (Figura 9). Alguno de los efectos dañinos de los antibióticos que bloquean la biosíntesis de proteínas puede deberse a su actuación sobre los ribosomas mitocondriales, que son semejantes a los bacterianos. El conocimiento sobre el efecto de los inhibidores de la biosíntesis de proteínas se ha ido incrementando a lo largo de los últimos años por la resolución de la estructura de los ribosomas y los complejos antibiótico-subunidad ribosomal a nivel atómico. La importancia de la resolución de la

estructura de ambas subunidades del ribosoma ha quedado reflejada en la concesión, en 2009, del premio Nobel de Química a Venkatraman Ramakrishnan, Thomas A. Steitz y Ada E. Yonath por “los estudios sobre la estructura y función del ribosoma”. Además, todo ello posibilita el diseño de otros potenciales agentes terapéuticos que interaccionen con el ribosoma [109]. Una revisión exhaustiva puede encontrarse en el trabajo de Daniel N. Wilson titulado “*The A-Z of bacterial translation inhibitors*” [110]. En la Figura 9 se recoge un esquema de la fase de formación del enlace peptídico durante la etapa de elongación de la cadena polipeptídica en crecimiento; se indican algunos ejemplos de antibióticos que bloquean la biosíntesis de proteínas y su modo de actuación.

En el ribosoma bacteriano, el centro de descodificación lo constituye una pequeña región del RNA ribosomal 16S de la subunidad 30S, y la unión del antibiótico puede producirse en un surco poco profundo (por ejemplo, la estreptomicina) o en el surco mayor de la hélice 44 del RNA 16S (p.e., los

antibióticos aminoglicosídicos). En el túnel de salida de la proteína recién formada los antibióticos interaccionan con nucleótidos del bucle del dominio V del RNA ribosomal 23S de la subunidad 50S (macrólidos y estreptogramina B) o en un nicho hidrofóbico (anisomicina, puromicina, cloranfenicol, etc.) [109].

Los aminoglicósidos se han descrito como un buen modelo para diseñar antibióticos por su unión con alta afinidad y su actividad de amplio espectro. Se enlazan a un lugar próximo al sitio catalítico del centro de descodificación (sitio A) lo que origina un cambio conformacional en la hélice 44 del RNA ribosomal 16S con la reorientación de dos adeninas de dicho RNA y provocando una disminución en la especificidad de las interacciones codón-anticodon [111]. Así, se pueden unir moléculas de RNA de transferencia cuyos anticodones no son los complementarios de los codones del RNA mensajero, incorporándose aminoácidos incorrectos a la cadena polipeptídica en formación y generando proteínas no funcionales. Aunque el efecto final es análogo, el lugar de unión de la estreptomicina difiere del ocupado por los aminoglicósidos (gentamicina, tobramicina, netilmicina, amicacina). Las tetraciclinas actúan uniéndose también al centro de descodificación del ribosoma en un lugar distinto al de los aminoglicósidos impidiendo, en este caso, la incorporación del RNA de transferencia o promoviendo su expulsión.

En la subunidad 50S, distintas bases nitrogenadas del dominio V del RNA ribosomal 23S constituyen las dianas del cloranfenicol, los macrólidos, las lincomasinas, las estreptograminas y las oxazolidinonas (linezolida) [112]. El cloranfenicol, la linezolida o la lincomicina, se unen a una región próxima al centro de actividad de la peptidil-transferasa; en el caso del cloranfenicol, éste actúa como un inhibidor competitivo de la enzima ya que el grupo amida del antibiótico se asemeja al enlace peptídico, bloqueando así la elongación. Sin embargo, se ha descrito que la linezolida y otras oxazolidinonas podrían ejercer su efecto al impedir la formación del complejo de iniciación de la traducción (subunidades 50S y 30S del ribosoma, RNA mensajero y RNA de transferencia) al inducir un cambio conformacional en el sitio A de la subunidad 50S impidiendo la entrada del RNA de transferencia [112]. Los macrólidos se unen a 2 bases de adenina situadas en el inicio del túnel de la salida del péptido,

cuyo bloqueo determina el desprendimiento del peptidil-tRNA. Las estreptograminas se unen tanto al centro de formación del enlace peptídico como a las mismas bases de adenina de la entrada del túnel a las que se fijan los macrólidos. Los cetólidos poseen un punto de anclaje adicional a una adenina del dominio II del RNA ribosomal que, en general, les permite seguir bloqueando el túnel de salida.

La mayor parte de los antibióticos que inhiben la biosíntesis de proteínas tienen como diana el RNA ribosómico, mientras que son escasos los que interaccionan con las proteínas o enzimas. Un ejemplo de éstos últimos es el ácido fusídico, que actúa por un mecanismo distinto: se une al factor de elongación EF-G ya unido al ribosoma y estabiliza el complejo formado entre ese factor y el GDP, bloqueando el proceso de translocación [113]. Otro grupo de antibióticos descritos recientemente son los inhibidores de las aminoacil-tRNA sintetasas, que están siendo utilizados para el control de infecciones tópicas causadas por cepas de *Streptococcus aureus* resistentes a meticilina ( $\beta$ -lactámico) y otras bacterias resistentes a los antibióticos "clásicos" [114, 115]. La mupirocina (mezcla de ácidos pseudomónicos) fue el primer antibiótico descrito dentro de este grupo; es un antibiótico de uso tópico que inhibe la isoleucil-tRNA sintetasa. Si se inhibe la enzima, la no disponibilidad del isoleucil-tRNA impide la incorporación de isoleucina a las cadenas polipeptídicas en crecimiento produciéndose un bloqueo de la síntesis proteica [116]. Se han descubierto otros inhibidores de aminoacil-tRNA sintetasas naturales, pero muchos de ellos no son específicos sólo para las dianas bacterianas o tienen un espectro muy restringido: indolmicina y chuangxinmicina (Trp), borrelidina (Thr), granaticina (Leu), furanomicina (Ile), ochratoxina A (Phe) o cispentacina (Pro) [114]. Los esfuerzos actuales van dirigidos a mejorar estos prometedores antibióticos naturales mediante procesos sintéticos para conseguir que sean específicos sólo para las aminoacil-tRNA sintetasas bacterianas y aumentar su eficacia [114].

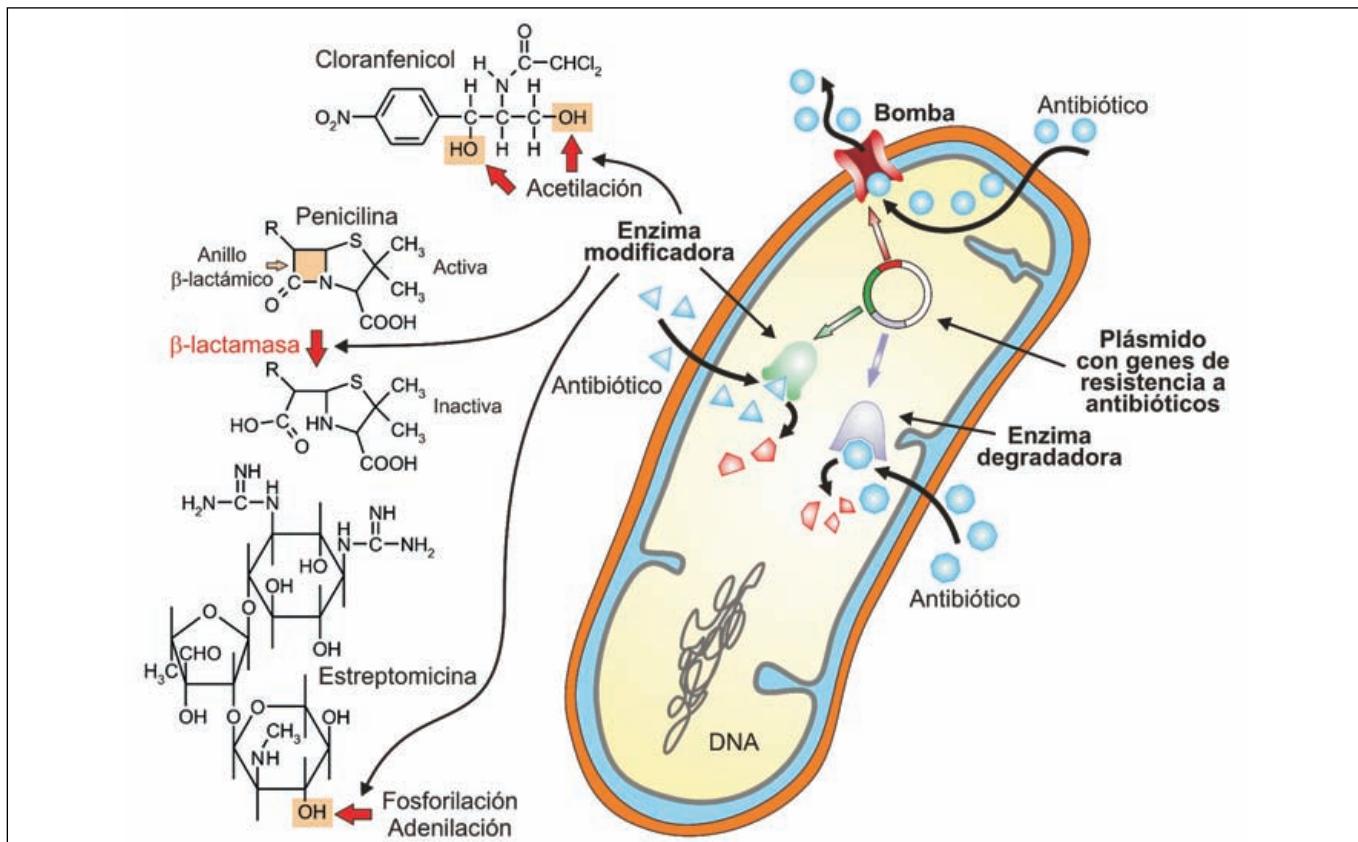
## RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS

De acuerdo con los datos recogidos por la Organización Mundial de la Salud, anualmente se producen millones de kilos de antibióticos de los que aproximadamente la mitad están destinados al tratamiento

humano y el resto se emplea en la alimentación del ganado. La Unión Europea, que con EE.UU. es el gran consumidor de antibióticos, concentra casi la mitad del consumo mundial. El abuso y mal uso de antibióticos (ingestión indiscriminada, administración incompleta de antibióticos, autotratamiento de infecciones víricas que no precisan terapia antibiótica) ha provocado lo que se conoce como *resistencia*: una selección natural por la cual las bacterias sufren cambios que les permiten evitar la acción del antibiótico. Existen numerosos ejemplos de antibióticos que han perdido su efectividad. El uso de la penicilina y las drogas sulfa, que fueron los primeros agentes quimioterápicos de amplio espectro, se redujo considerablemente porque muchos patógenos son resistentes frente a ellos. La bacteria gram-positiva *Staphylococcus aureus* se encuentra en la piel de los individuos sanos, pero hay cepas que son fuente de infecciones nosoco-

miales que han adquirido resistencia frente a la penicilina y frente a penicilinas resistentes a  $\beta$ -lactamasas (como la oxacilina, cloxacilina y dicloxacilina o a la meticilina, una penicilina de cuarta generación). La propagación de las bacterias resistentes, que pone en peligro el tratamiento de enfermedades bacterianas, es un problema socio-sanitario del que se han hecho eco los políticos y los medios de comunicación. Con campañas se informa al público y se dan recomendaciones para el uso racional de los antibióticos. Por otra parte, los científicos tratan de buscar nuevas formulaciones que sean efectivas frente a los patógenos resistentes.

En 1939 René Dubos (1901-1982) descubrió la gramicidina [117], producida por cepas de *Bacillus brevis*, el primer antibiótico que se ensayó clínicamente pero que, debido a su elevada toxicidad, se utilizó únicamente de forma tópica. El trabajo lo con-



**Figura 10. Mecanismos de la resistencia a fármacos.** Las bacterias pueden adquirir resistencia a la acción de antibióticos por diferentes mecanismos. Se puede evitar que el antibiótico entre en la célula, como las bacterias gram-negativas (resistentes a la benzilpenicilina por la constitución de su pared celular impermeable al antibiótico), o se pueden alterar las proteínas de unión de penicilina. Los plásmidos con genes de resistencia a antibióticos pueden codificar proteínas transportadoras (bombas) que bombean el antibiótico al exterior, o se pueden sintetizar enzimas degradadoras o modificadoras del antibiótico. En la parte izquierda de la figura se muestran ejemplos de modificaciones sobre la estructura del cloranfenicol (por acetilación de dos grupos hidroxilos), de la penicilina (por ruptura del anillo  $\beta$ -lactámico) y de la estreptomicina (por acetilación o fosforilación de un grupo hidroxilo).

### TABLA III: Mecanismos de resistencia en bacterias

#### **Disminución de la concentración de antibiótico en el interior de la bacteria**

##### **Reducción de la permeabilidad**

Penicilinas (Cromosómica: *P. aeruginosa* y bacterias entéricas)

##### **Eflujo (bombeo del fármaco hacia el exterior de la célula)**

Están implicadas translocasas de membrana

Tetraciclinas (Plasmídica: *S. aureus*)

Cloranfenicol (Cromosómica: *B. subtilis*)

#### **Inactivación del antibiótico por modificación química**

Enzima: penicilinasa ( $\beta$ -lactamasa)

$\beta$ -lactámicos (penicilinas) (Plasmídica y cromosómica: *S. aureus*, bacterias entéricas y *N. gonorrhoeae*)

Enzima: acetilasas

Cloranfenicol (Plasmídica y cromosómica: *S. aureus* y bacterias entéricas)

Enzimas: fosforilasas y adenilasas

Aminoglicósidos (Estreptomicina) (Plasmídica: *S. aureus*)

#### **Alteración de la diana del antibiótico**

Mutaciones en la DNA girasa y/o topoisomerasa IV

Ciprofloxacino (fluoro-4-quinolona). (Cromosómica: *S. aureus*, *S. pneumoniae*)

Mutaciones en la subunidad  $\beta$  de la RNA polimerasa

Rifampicina. (Cromosómica: *M. tuberculosis*)

Metilaciones y mutaciones en el rRNA 23S

Eritomicina, kincosamida (macrólidos). (Cromosómica: *S. aureus*)

Mutaciones en el rRNA 16S y en la proteína ribosomal S12 de la subunidad 30S

Estreptomicina (aminoglicosídicos). (Cromosómica: *M. segmentatis*, *M. tuberculosis*)

Mutaciones en el factor de elongación EF-G

Ácido fúnsico. (Cromosómica: *S. aureus*)

#### **Rutas metabólicas alternativas no bloqueadas por el antibiótico**

Sulfonamidas (Cromosómica: bacterias entéricas, *S. aureus*)

A diferencia de las bacterias sensibles a sulfonamidas, las resistentes no requieren el ácido *p*-aminobenzoico como precursor para la síntesis de ácido fólico.

Se recoge el mecanismo de resistencia, algunos ejemplos de antibióticos, algunas de las bacterias concretas en las que se ha descrito y la base genética de la resistencia. [*B. subtilis*: *Bacillus subtilis*; *M. segmentatis*: *Mycobacterium segmentatis*; *M. Tuberculosis*: *Mycobacterium tuberculosis*; *N. gonorrhoeae*: *Neisseria gonorrhoeae*; *P. aeruginosa*: *Pseudomonas aeruginosa*; *S. aureus*: *Staphylococcus aureus*; *S. pneumoniae*: *Streptococcus pneumoniae*]

tinuó Florey quien describió que la exposición prolongada de las bacterias a antibióticos resultaba frecuentemente en el desarrollo de cepas resistentes [118]. Así, por ejemplo, en *Streptococcus pneumoniae*, la exposición durante décadas a antibióticos  $\beta$ -lactámicos resultó en la adquisición secuencial de múltiples mutaciones en las proteínas de unión a penicilina. También es el caso de las infecciones hospitalarias detectadas en 1961 por varias cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina [119].

La resistencia puede tener una base cromosómica, si se expresan genes reprimidos o se expresa una diana mutada, o una base plasmídica, en el caso de que el

gen del producto que confiere resistencia esté codificado en un plásmido adquirido por conjugación bacteriana. En el proceso de conjugación, las bacterias sensibles a antibióticos pueden recibir un plásmido que les proporcione resistencia frente a los antibióticos. Este plásmido puede contener diferentes genes que codifiquen la resistencia para más de un antibiótico. Esta resistencia puede transmitirse a las siguientes generaciones ya que los plásmidos se heredan. Por ejemplo, el plásmido RP1 codifica la resistencia a ampicilina, tetraciclina y kanamicina en *Pseudomonas* y en *Enterobacteriaceae* [120]. Además, diferentes tipos de bacterias pueden emplear distintos mecanismos de resistencia frente a un mismo fármaco.

Los mecanismos por los que los microorganismos pueden adquirir resistencia a los antibióticos son variados; algunos de ellos se muestran en la Figura 10 y se detallan en la Tabla III. Así, se puede evitar que el antibiótico entre en la célula, como las bacterias gram-negativas (resistentes a la bencilpenicilina por la constitución de su pared celular impermeable al antibiótico), se pueden alterar las proteínas de unión de penicilina, o se puede modificar la diana bioquímica del antibiótico. Las mutaciones en proteínas codificadas por genes cromosómicos, o la expresión de genes silenciados, rindiendo proteínas incapaces de unirse al antibiótico y, por lo tanto, insensibles a su efecto, pueden también culminar con la resistencia [121]. Los plásmidos con genes de resistencia a antibióticos pueden codificar proteínas transportadoras (bombas) que expulsan el antibiótico al exterior limitando la concentración interior del antibiótico. También se pueden sintetizar enzimas que degradan o que modifican al antibiótico, o que lo inactivan por cambios en su estructura química mediante hidrólisis del núcleo activo, acetilación, fosforilación, etc.

El péptidoglicano componente de la pared bacteriana es un ejemplo de diana selectiva por su papel esencial en el crecimiento y supervivencia de las bacterias. Las enzimas que están implicadas en su síntesis y ensamblaje son un blanco excelente para producir una inhibición selectiva [54]. Las más importantes son las transpeptidasas y las transglucosidasas (dianas de los  $\beta$ -lactámicos y los glicopéptidos, respectivamente). En algunos casos, la modificación en la diana que genera la resistencia al antibiótico requiere cambios adicionales en otros componentes celulares para compensar las nuevas características de la diana modificada. Un ejemplo es la adquisición de una transpeptidasa alterada, MecA, en *Staphylococcus aureus* que proporciona resistencia a meticilina y a la mayoría de los  $\beta$ -lactámicos. Para ejercer su función de forma eficiente en la biosíntesis del péptidoglicano, MecA altera la composición y estructura del péptidoglicano, lo cual implica el funcionamiento de otros genes adicionales. La clase B de las PBP juega un papel importante en la resistencia a  $\beta$ -lactámicos en muchas bacterias. En bacterias gram-positivas la resistencia es debida a la presencia de una PBP endógena o adquirida que puede catalizar, aun en presencia de penicilina, la formación de enlaces de entrecruzamiento en el péptidoglicano, como ocurre con la PBP2a en *S. aureus*. Sin embargo,

una PBP similar en *L. monocytogenes* es responsable de la resistencia a monobactamos y cefalosporinas pero no a penicilina [122]. En cepas de *H. pylori* que carecen de actividad  $\beta$ -lactamasa, se describió que en el fenotipo resistente a amoxicilina estaban implicadas las PBP [123]. En *S. pneumoniae*, la resistencia se basa en la presencia de unas PBP que tienen baja afinidad por la penicilina [124]. En *E. faecium*, variantes de PBP5 con diferente nivel de resistencia a  $\beta$ -lactámicos se han relacionado con combinaciones de mutaciones [125]. También se han descrito otros cambios en la pared bacteriana. Los glicopéptidos antibióticos, como la vancomicina, inhiben la biosíntesis de la pared bacteriana porque se unen no covalentemente a la región terminal del peptidil-D-Ala-D-Ala de los precursores del péptidoglicano. En las bacterias resistentes, el espesor de la pared se duplica y se sintetizan péptidoglicanos con glutamina poco entrecruzados. La vancomicina quedaría retenida en la pared celular reduciéndose su concentración efectiva en el citoplasma donde están sus dianas, las transglucosidasas [126]. Por otro lado, se pueden modificar los precursores de los péptidoglicanos, con la expresión de genes que producen una deshidrogenasa (cataliza la transformación de piruvato a D-Lactato) y una ligasa que sintetiza el D-Ala-D-Lactato, que se incorpora al péptidoglicano; a esta región los glicopeptidos se unen con una afinidad mucho menor [127].

La resistencia a  $\beta$ -lactámicos [52] puede también deberse a cambios en la permeabilidad de la pared bacteriana al antibiótico, a la existencia y eficacia de los mecanismos de excreción del compuesto, a una inactivación enzimática del antibiótico por producción de  $\beta$ -lactamasas (activas frente a penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos y carbopenémicos), a la modificación de las PBP (presencia, espectro de acción y afinidad de las proteínas de unión a penicilina), a modificaciones en la afinidad del antibiótico por el sitio activo de la PBP y a cambios en la tolerancia. El principal mecanismo de resistencia del *Staphylococcus aureus* a la penicilina es la expresión de  $\beta$ -lactamasa (initialmente denominada penicilina hidrolasa) que confiere resistencia frente a penicilinas naturales (penicilina G) y aminopenicilinas (ampicilina y amoxicilina). La actividad de penicilinasa se describió en 1940 por Abraham y Chain [128] al observar que un extracto de *E. coli* inactivaba soluciones de penicilina. En 1944 W.M. Kirby observó que la producción de la

enzima se correlacionaba con la resistencia a penicilina en extractos de *S. aureus* [129]. La  $\beta$ -lactamasa rompe el enlace amida del núcleo  $\beta$ -lactámico de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, transformándolos irreversiblemente en compuestos inactivos incapaces de ejercer su acción antibiótica; esta enzima presenta una mayor afinidad por el antibiótico que el que éste tiene por su diana. La expresión de las  $\beta$ -lactamasas puede ser constitutiva, no requiriéndose la presencia de inductor por lo que la enzima se encuentra siempre presente, o inducibles, que están codificadas por un gen sujeto a una represión activa pero que se induce en presencia de un inductor. Se pueden excretar al medio (exoenzimas) en bacterias gram-positivas o pueden quedar en el espacio periplásмico en bacterias gram-negativas. Se han descrito numerosas  $\beta$ -lactamasas que están codificadas en el cromosoma bacteriano, con unas características que dependen del género, especie o subespecie de la bacteria, y otras están codificadas en genes plasmídicos. Ciertos antibióticos, como la ceftriaxona y la ceftazidima son estables en presencia de  $\beta$ -lactamasas codificadas en genes plasmídicos mientras que las codificadas en genes cromosómicos, como en el caso de *Enterobacter*, son enzimas que hidrolizan prácticamente a todas las penicilinas y cefalosporinas.

El incremento de cepas productoras de penicilinasa hizo que en los años 60 se introdujeran las aminopenicilinas y las cefalosporinas, antibióticos frente a los cuales también, con el tiempo, se detectaron cepas resistentes por producción de nuevas  $\beta$ -lactamasas. Una solución que se utiliza para evitar este problema es realizar el tratamiento combinado del antibiótico con inhibidores de las  $\beta$ -lactamasas, como el ácido clavulánico.

Para paliar el problema de la resistencia, la estructura química de los antibióticos ha ido mejorándose para conseguir una mayor eficiencia, incrementar el espectro de acción y atacar a microorganismos resistentes [107]. Un ejemplo lo constituye la evolución de las cefalosporinas. La primera cefalosporina, que tiene efecto bactericida, se aisló de cepas del hongo *Cephalosporium acremonium* en 1946 por Giuseppe Brotzu (1895-1976); las cepas producían una sustancia eficaz contra la salmonela, *Salmonella typhi*, causante de la fiebre tifoidea [130]. La estructura química de las cefalosporinas deriva del

ácido-7-cefalosporánico que, al igual que la penicilina, tiene un anillo  $\beta$ -lactámico y, además, un anillo dihidrotiazínico. Su modo de acción se basa en la inhibición de la síntesis del péptidoglicano de la pared celular bacteriana y bloquea la transpeptidación. En distintas formulaciones, el núcleo de la cefalosporina se ha modificado para mejorar sus propiedades y los derivados activos se han agrupado en "generaciones" en función de sus características antimicrobianas; se han establecido cuatro generaciones. Desde las de "primera generación" el espectro de actuación se ha extendido y su potencia es mayor frente a cocos gram-positivos a microorganismos gram-negativos a la vez que se ha ido incrementado la resistencia a  $\beta$ -lactamasas.

La mayoría de otras clases de agentes antimicrobianos actúan sobre dianas que también están presentes en las células de mamíferos pero difieren suficientemente para conseguir una actuación selectiva. Pueden ser proteínas que participan en la replicación del DNA, en la transcripción vía RNA polimerasa, en la segregación de cromosomas y en el control de su integridad, y en reacciones metabólicas esenciales. Muchas de estas dianas, ya que participan en mecanismos vitales para la bacteria, no pueden ser eliminadas o anuladas en las bacterias que adquieren resistencia a los antibióticos. Los cambios en las dianas por mutaciones reducen la susceptibilidad al efecto del antibiótico pero mantienen su actividad celular. El blanco de las fluoroquinolonas son las enzimas DNA girasa de bacterias gram-negativas así como la topoisomerasa IV de bacterias gram-positivas. Mutaciones cromosómicas en subunidades de ambas enzimas, que disminuyen la afinidad por el antibiótico, se han detectado en bacterias resistentes a estos antibióticos. Las mutaciones en la topoisomerasa IV son más frecuentes que las que afectan a la DNA ligasa [131, 132]. Las mutaciones puntuales, delecciones e inserciones en el gen de la subunidad  $\beta$  de la RNA polimerasa detectadas en *M. tuberculosis* producen resistencia a rifamicinas, antibióticos utilizados contra la tuberculosis [133].

Los antibióticos que tienen como diana el ribosoma interaccionan principalmente con moléculas de RNA, por lo que alteraciones en estas moléculas por metilación y mutación dan también cuenta de la resistencia de algunos microorganismos a ciertos antibióticos. Los

macrólidos, como la lincosamida y la estreptogramina B, se unen a la subunidad 50S del ribosoma inhibiendo la síntesis de proteínas. Uno de los mecanismos de resistencia detectados frente a este tipo de antibióticos consiste en la modificación del RNA 23S por metilación o dimetilación, mediante una adenina N-metiltransferasa, de las bases adenina críticas para la unión del antibiótico y que están situadas en el inicio del túnel de la salida del péptido. En segundo lugar, se han descrito múltiples mutaciones en el RNA 23S próximas a los sitios de metilación; a éstas hay que sumar las alteraciones que se producen en las proteínas L4 y L22 constituyentes de la subunidad 50S del ribosoma procarionte [134]. Otras mutaciones descritas relacionadas con resistencia a antibióticos afectan al RNA 16S y a proteínas de la subunidad menor del ribosoma, como las descritas en la resistencia a aminoglicosídicos [121].

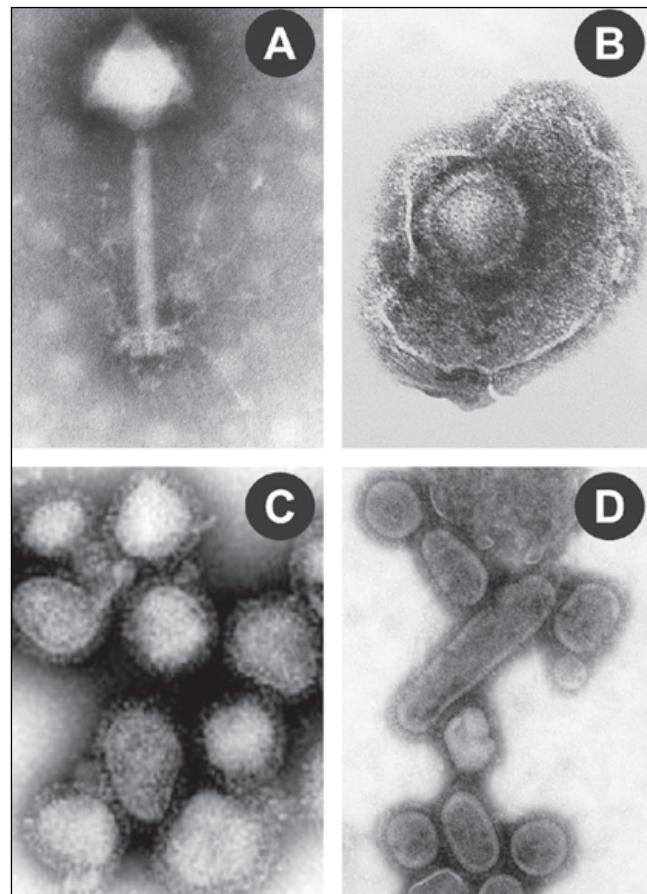
Algunas mutaciones en enzimas que catalizan reacciones esenciales del metabolismo microbiano también pueden ser causa de resistencia. La mutación en el gen *dhfr*, que codifica a la dihidrofolato reductasa, genera un cambio en un aminoácido responsable de la resistencia a trimetoprima. Otras actividades enzimáticas también pueden modificarse, como la enoil-reductasa que participa en la biosíntesis de ácidos grasos, como se ha descrito en *M. tuberculosis*.

Ante este panorama complejo, ya que son múltiples los mecanismos que explican dicha resistencia, se ha tratado siempre de desarrollar nuevos antibióticos que combatan a las bacterias resistentes. La tigeciclina, bacteriostático cuyo uso se aprobó en 2005, es el primero de una familia de antibacterianos de amplio espectro: las glicilciclinas, derivadas y estructuralmente similares a las tetraciclinas. Inhibe la biosíntesis de proteínas por unión a la subunidad 30S del ribosoma bacteriano impidiendo la correcta lectura del RNA mensajero. En ensayos *in vitro* es activa frente a patógenos gram-positivos que son resistentes a múltiples drogas, entre ellos *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina y enterococos resistentes a vancomicina; su afinidad por el ribosoma es muy elevada y no es un sustrato de las bombas de expulsión que extraen a otros antibióticos [135]. Además de estudiarse posibles modificaciones estructurales de los antibióticos utilizados terapéuticamente para hacerlos más eficaces o para que eviten o combatan la resis-

tencia, otras posibilidades quedan abiertas para la descripción de nuevas moléculas, como las implicadas en la inhibición del ensamblaje de los ribosomas [136]. La lista de antibióticos que pueden ser descritos, considerando el problema de la diversidad de mecanismos de resistencia, permanece todavía abierta [110].

## VIRUS

Los virus (del latín *virus*, “toxina” o “veneno”) son parásitos intracelulares obligados, agentes infecciosos microscópicos con capacidad para mutar, que infectan a todo tipo de organismos (animales, plantas, bacterias y arqueas). Se ha descrito que puede haber del orden de  $10^{31}$  virus en la tierra, la mayoría fagos que infectan



**Figura 11.** Micrografías electrónicas mostrando diferentes virus. Imágenes de microscopía electrónica de transmisión (A) del fago S-PM2 de *Synechococcus*, (B) del virus de la varicela-zoster o virus herpes humano tipo 3, (C) del virus de la gripe de Hong Kong (subtipo H3N2) que causó la epidemia de 1968 y (D) del virus de la gripe reconstruido (subtipo H1N1), que causó la pandemia de 1918 o virus de la gripe española.

bacterias; en 200 litros de agua de mar existen más de 5.000 genotipos virales y alrededor de un millón en un kilogramo de sedimento marino [137]. Su organización es simple, acelular y están compuestos de material genético (una o más moléculas de DNA o de RNA) y, a veces, alguna enzima viral, envueltos por una cápsida o cubierta proteica formando la nucleocápsida que, a su vez, puede estar recubierta por una capa o envoltura lipídica. Los viriones (formas o partículas completas del virus en el espacio extracelular) no tienen capacidad de reproducirse de forma independiente, necesitan células vivas para su multiplicación. Después de infectar a una célula susceptible, y una vez en su interior, el material genético de los virus se replica y, utilizando la maquinaria biosintética de las células hospedadoras, se obtienen las proteínas virales. Los componentes virales se ensamblan y se forma la nueva progenie de viriones.

El tamaño de los virus es variable, desde 10 nm (algo mayor que un ribosoma) hasta unos 400 nm de diámetro (equivalente al de las bacterias más pequeñas). Debido a su tamaño, para su visualización se requiere utilizar la microscopía electrónica de transmisión o de barrido. Según su morfología se clasifican en icosaédricos (forma poliédrica), helicoidales (similares a un cilindro hueco), con envoltura (si la nucleocápsida está rodeada de una membrana lipídica) y virus complejos (que contienen otras estructuras adicionales). En la Figura 11 se muestran imágenes obtenidas por microscopía electrónica de diferentes virus. En la página web <http://www.utmb.edu/ihii/virusimages/index.shtml> se puede encontrar una colección de micrografías electrónicas correspondientes a imágenes de diferentes tipos de virus obtenidas por Frederick A. Murphy de la Universidad de Texas.

Los virus se pueden clasificar atendiendo a la naturaleza de su material genético, lo que a su vez condiciona el mecanismo de su replicación y de síntesis de RNA mensajero. En la Tabla IV se recoge la clasificación de Baltimore, que se basa en estos aspectos y ordena a los virus en siete clases [138]. Hay virus que contienen DNA monocatenario (virus pequeños como el DNA circular del bacteriófago  $\phi$ X174 o la cadena simple de los parvovirus), DNA bincatenario (virus bacterianos como el fago  $\lambda$  o el virus del herpes), RNA monocatenario [como virus de plantas, virus de la

polio (RNA+), el de la rabia: rabdovirus (RNA-), etc.] y RNA bicatenario (como reovirus y el fago  $\phi$ 6). El tamaño del material genético es muy variable, desde genomas pequeños ( $10^6$  Da) a grandes ( $1,6 \times 10^8$  Da), y contienen la información genética para obtener desde tres o cuatro proteínas a más de 100. Diversos ejemplos sencillos pueden ilustrar cómo los bacteriófagos transcriben su material genético. Los fagos  $\phi$ X174 y T4 utilizan directamente la RNA polimerasa de la célula que infectan, la célula huésped. Los fagos T7 y T3 cuando infectan a *E. coli* utilizan la RNA polimerasa de la bacteria para expresar los genes tempranos; uno de los productos de estos genes tempranos es una RNA polimerasa viral que se encarga de la expresión de genes tardíos y factores que inhiben a la RNA polimerasa de *E. coli*. En conjunto, los virus consiguen adueñarse de la maquinaria biosintética de *E. coli* de tal forma que la bacteria no pueda expresar su genoma y quede supeditada a la expresión del material genético viral. Otro ejemplo es el fago N4 que, al infectar a la bacteria, inyecta además de su DNA viral, una RNA polimerasa viral. Por último, el fago Q $\beta$  inyecta su material genético (el RNA Q $\beta$ ) en el que está codificada una cadena polipeptídica de 55 kDa que, junto con tres proteínas de la célula huésped (que participan en la fase de elongación de la biosíntesis de proteínas, los factores EF, Tu y Ts), forman la holoenzima RNA polimerasa dependiente de RNA o Q $\beta$  replicasa. Esta replicasa tiene una gran especificidad por el RNA Q $\beta$  y se encarga de replicarlo.

Dada la diversidad del material genético, la replicación de su genoma queda condicionado por el tipo de ácido nucleico que contenga; este proceso en un ejemplo de un virus concreto, el virus de la hepatitis C, se considera posteriormente. De forma general el ciclo de replicación o ciclo vital de un virus se puede dividir en distintas etapas. Los virus dotados de envoltura pueden entrar en la célula por dos tipos de mecanismos distintos, unos liberan su genoma en el citoplasma de la célula diana mediante fusión directa de su envoltura con la membrana plasmática y otros entran en la célula mediante diferentes mecanismos de endocitosis antes de liberar su genoma al citoplasma [139]. Después de la unión o adsorción a la superficie celular e inyección del material genético viral, se produce la replicación de éste, la síntesis de las proteínas virales (entre las que se encuentran las de la envoltura) y su procesamiento, el empaquetamiento del material genético y el ensam-

TABLA IV: Clasificación de Baltimore de los virus

Clase	Genoma	Síntesis de mRNA/Replicación	Ejemplos
I	DNA bicatenario	Traducción directa tras entrada del genoma viral en el núcleo (excepto Poxvirus, que lo hace en el citoplasma). Replicación directa por polimerasas de la célula infectada.	Herpesvirus (herpes simple, varicela) Adenovirus Papovavirus (virus del papiloma)
II	DNA monocatenario	Requieren la formación previa de DNA bicatenario en el núcleo.	Circovirus Parvovirus
III	RNA bicatenario	Traducción monocistrónica y replicación en el citoplasma.	Reovirus Birnavirus
IV	RNA monocatenario hebra (+)	mRNA policistrónico idéntico al genoma, que se traduce normalmente en una poliproteína. Replicación en el citoplasma previa síntesis de la hebra RNA (-) que se utiliza como molde.	Astrovirus Calicivirus Coronavirus (SARS) Flavivirus (hepatitis C) Picornavirus (polio, hepatitis A) Arterivirus Togavirus (rubeola)
V	RNA monocatenario hebra (-)	Transcripción previa a hebra (+) en el citoplasma (genomas no segmentados) o en el núcleo (genomas segmentados) por RNA polimerasas dependientes de RNA virales. Replicación del genoma utilizando como molde de hebra RNA (+).	Arenavirus Bunyavirus Ortomixovirus (gripe) Paramixovirus (sarampión, VSR) Filovirus (virus Ébola y Marburg) Rabdovirus (rabia)
VI	RNA monocatenario hebra (+)	Transcripción inversa a DNA, que se integra en el genoma del huésped y es transcrita (y replicado) por las polimerasas nucleares.	Retrovirus (VIH)
VII	DNA bicatenario	Transcripción directa a RNA y replicación de este RNA por transcripción inversa.	Hepadnavirus (hepatitis B)

blaje de la envoltura proteica y liberación final de las partículas virales. Cualquiera de estas etapas puede considerarse blanco de fármacos antivirales.

Los retrovirus han sido foco de atención porque son responsables de enfermedades graves, como algún tipo de cáncer y del síndrome de inmunodeficiencia adquirida [SIDA, provocada por el virus de la inmunodeficiencia humana de tipos 1 (VIH-1) y 2 (VIH-2)]. Los virus de la inmunodeficiencia humana atacan a los linfocitos T CD4 positivos produciendo su lisis, lo que provoca una inmunodepresión. Los retrovirus contienen como material genético RNA monocatenario que se replica de una forma particular, a través de la síntesis de una molécula de DNA de doble cadena,

proceso conocido como la transcripción inversa. Este proceso lo realiza la enzima transcriptasa inversa o retrotranscriptasa, característica de estos virus y que dirige la síntesis de DNA a través del RNA viral. El DNA sintetizado se inserta en los cromosomas de la célula infectada y se transcribe como un gen huésped.

## ALGUNOS APUNTES HISTÓRICOS SOBRE LOS DESCUBRIMIENTOS DE LOS VIRUS

En la Tabla V [15, 38, 59-61, 140-170] se recogen algunos de los descubrimientos, hechos y científicos descubridores que han sido clave en el desarrollo de la

TABLA V: Algunos descubrimientos clave en el desarrollo de la Virología

Año*	Investigador	Descubrimiento
<b>SIGLO XVIII</b>		
1796	Edward Jenner (1749-1823)	Describe la vacuna contra la viruela a partir de experimentos que realizó con gérmenes de la <i>viruela boba</i> (manifestación leve de viruela que afecta mayoritariamente a las ubres de las vacas). Su descubrimiento de la vacuna antivariólica fue clave para combatir la viruela que, en el siglo XVIII, era una de las enfermedades epidémicas con un mayor índice de mortalidad [15].
<b>SIGLO XIX</b>		
1857-1885	Louis Pasteur (1822-1895)	Además de las vacunas frente al cólera y el ántrax [59, 60], también descubre la vacuna contra la rabia, enfermedad causada por un rhabdovirus [61]. (ver Tabla I)
1884	Charles Chamberland (1851-1908)	Desarrolla un tipo de filtración, utilizando filtros con poros más pequeños que el tamaño de una bacteria ("filtro Chamberland-Pasteur"), que le permitió postular la presencia en el filtrado de un nuevo agente infeccioso, los virus. Trabajó en la esterilización de medios de cultivo lo que, en 1879, le llevó a inventar el autoclave.
1892	Dimitri Ivanovsky (1864-1920)	Uno de los primeros científicos que evidenciaron la existencia de unos nuevos patógenos infecciosos. Descubrió unas partículas minúsculas responsables de la enfermedad del mosaico del tabaco (de extractos de hojas molidas de plantas de tabaco) que atravesaban los filtros de porcelana, algo que las bacterias no podrían hacer. Los extractos de hojas molidas de plantas de tabaco infectadas todavía eran infecciosos después de filtrarlos. Ivanovsky sugirió que la infección podría ser causada por una toxina producida por las bacterias, aunque no encontró la bacteria responsable [140].
1899	Martinus Willem Beijerinck (1851-1931)	Considerado uno de los fundadores de la Virología, pionero de la Microbiología por sus estudios sobre la naturaleza de los virus. Demostró a partir de los experimentos de Ivanovsky que el agente patógeno responsable de la enfermedad del mosaico del tabaco de las plantas es mucho más pequeño que una bacteria, por su carácter filtrable y por no ser visible en el microscopio. Al agente infeccioso que denominó "virus filtrable" lo bautizó como <i>Contagium Vivum Fluidum</i> o "germen viviente soluble" [141] (actualmente se conoce como el virus del mosaico de tabaco).
1898	Friedrich August Johannes Loeffler (1852-1915)	Descubrimiento del agente que causa la fiebre aftosa el aphthovirus, virus perteneciente a la familia <i>Picornaviridae</i> [142, 143]. Además descubrió la bacteria causante de la difteria (Tabla I).
<b>SIGLO XX</b>		
1900	Walter Reed (1851-1902)	Dirigió el equipo que confirmó la teoría, expuesta por primera vez en 1881 por Carlos Finlay (1833-1915) (teoría metaxénica de transmisión de enfermedades por agentes biológicos), de que la fiebre amarilla, que es causada por virus de la familia <i>Flaviviridae</i> , se transmite por mosquitos.
1907	Ross Granville Harrison (1870-1959)	Uno de los primeros en trabajar con éxito con cultivos celulares; utiliza métodos asepticos. Se considera uno de los padres de los cultivos celulares <i>in vitro</i> . Mantiene en cultivo fragmentos de cresta neural de embriones de rana durante varias semanas utilizando como nutriente un coágulo linfático [144]. Los cultivos celulares han sido claves para la producción de virus.

Año*	Investigador	Descubrimiento
1911	Francis Peyton Rous (1879-1970)	En 1910 describe un sarcoma de pollo que puede ser propagado transplantando sus células en otros hospedadores, induciéndose tumores [145]. Más tarde se demostró que esas células contenían un virus de RNA (virus del sarcoma de Rous), el primer virus oncogénico, un retrovirus que causa sarcoma en pollos. En 1966 fue galardonado con el premio Nobel de Medicina o Fisiología por “el descubrimiento de virus con capacidad de inducir tumores”.
1913	Edna Steinhardt, Clara Israeli y Robert A. Lambert	Utilizaron el método de cultivo de tejidos en linfa (descrito por Harrison) para cultivar el virus vaccinia (virus vacuna, poxvirus) en fragmentos de tejido corneal de conejos [146].
1915-1917	Félix d'Herelle (1873-1949)	Describió, infectando cultivos de bacterias en placas, un “microbio invisible, antagónico del bacilo de disentería” que infectaba y mataba bacterias, al que denominó fago. Es el descubridor de los virus que infectan bacterias (bacteriófagos). Afirmó que los fagos se reproducen “alimentándose” de las bacterias [147]. Inventor de la terapia fágica, un arma contra las enfermedades bacterianas y alternativa a los antibióticos.
1917	Alexis Carrel (1873-1944)	Mejoró el método de cultivo de tejidos desarrollado por Ross Granville Harrison, usando suero sanguíneo en lugar de linfa. Además, demuestra que los virus pueden ser crecidos en cultivos de tejidos. En 1912 recibe el premio Nobel de Medicina o Fisiología por “sus trabajos sobre sutura vascular y trasplante de vasos sanguíneos y órganos”.
1925	Jules Bordet (1870-1961) y Oscar Bail (1869-1927)	Descubren de forma independiente el fenómeno que Bordet denominó lisogenia. Éste describe que algunos cultivos de bacterias exhiben autolisis transmisible, lo que le hizo pensar que era una característica heredada (visión lamarckiana). Da nombre al fenómeno pero no lo relaciona con virus. Bail demuestra, estudiando la cepa 88 de <i>E. coli</i> , que la lisogenia es producida por clones que producen fagos.
1928	Max Theiler (1899-1972)	En 1927 refutó la idea de que la fiebre amarilla era causada por una bacteria; un año después se identificó como agente patógeno a un virus. En 1928 mostró que los virus de África y Sudáfrica eran idénticos inmunológicamente. En 1937 desarrolló la vacuna 17D contra la fiebre amarilla. Fue premio Nobel de Medicina o Fisiología en 1951 por “sus descubrimientos acerca de la fiebre amarilla y como combatirla”.
1928	Hugh Bethune Maitland (1895-1972) y Mary Cowan Maitland	Cultivaron el virus vaccinia en suspensiones de riñones troceados de gallina [148]. Su método no fue usado hasta 1950 cuando se empezó a cultivar poliovirus a gran escala para la producción de vacunas.
1931	Ernest William Goodpasture (1886-1960)	Desarrolló métodos para el cultivo de virus utilizando embriones de pollo y huevos fertilizados de gallina [149]. Este método permitió el desarrollo de vacunas contra diferentes enfermedades (gripe, varicela, viruela y fiebre amarilla).
1931	Ernst August Friedrich Ruska (1906-1988)	Junto a Max Knoll (1897-1969) inventó el microscopio electrónico. En 1986 recibió el premio Nobel de Física, “por su trabajo fundamental en la óptica de electrones y por el diseño del primer microscopio”, que compartió con Gerd Binnig (1947- ) y Heinrich Rohrer (1933- ) “por su diseño del microscopio de efecto túnel”. Fue uno de los primeros científicos que visualizó y estudió estructuras submicroscópicas, como virus, por microscopía electrónica [150].
1935	Wendell Meredith Stanley (1904-1971)	Sus investigaciones sobre el virus causante de la enfermedad del mosaico del tabaco le llevaron al aislamiento y cristalización del virus [151]. Fue galardonado, junto con John Howard Northrop (1891-1967), con el premio Nobel de Química en el año 1946 por “la preparación de enzimas y proteínas virales en una forma pura”.

Año*	Investigador	Descubrimiento
1937	Frederick Charles Bawden (1908-1972) y Norman Wingate Pirie (1907- 1997)	Pioneros en la investigación sobre virus de plantas. Obtiene nifentas fracciones de hojas infectadas con el virus del mosaico del tabaco que difieren en su infectividad, propiedades físicas y composición química. Describen que el virus está compuesto por nucleoproteína y un ácido nucleico que es RNA [152].
1941	John Desmond Bernal (1901-1971) e Isidor Fankuchen (1905-1964)	Realizan estudios físicos sobre el virus del mosaico del tabaco. Pioneros en la difracción de rayos X; aportan las primeras imágenes del virus del mosaico del tabaco cristalizado [153,154].
1949	John Franklin Enders (1897-1985), Thomas Huckle Weller (1915-2008) y Frederick Chapman Robbins (1916-2003)	Descubren que el virus de la polio es capaz de multiplicarse en cultivos de células de origen no neuronal siendo la primera vez que se cultivaba un virus sin utilizar tejidos animales sólidos o huevos [155]. Recibieron el premio Nobel de Medicina o Fisiología en 1954 por “sus descubrimientos sobre la capacidad del virus de la poliomielitis para crecer en cultivo de varios tipos de tejidos”.
1950	André Michael Lwoff (1902-1994)	Mostró que las bacterias lisogénicas pueden crecer y dividirse sin liberar fagos al medio de cultivo ya que éstos se encuentran en forma de precursor no infeccioso (al que denominó <i>profago</i> ). La lisis de algunas de estas bacterias lisogénicas se induce cuando se estimulan (p.e. con luz ultravioleta) para producir fagos. Junto con François Jacob (1920-) y Jacques Monod (1910-1976), recibió en 1965 el premio Nobel de Medicina o Fisiología por sus “descubrimientos sobre el control genético de las enzimas y la síntesis de virus”.
1952	Alfred Day Hershey (1908-1997) y Martha Chase (1927-2003)	Demostraron con el denominado experimento Hershey-Chase que el DNA era el material genético del fago T2 y que ese material, el DNA, era introducido en las células huésped bacterianas ( <i>E. coli</i> ) [156]. En 1969 Hershey fue distinguido con el premio Nobel en Fisiología o Medicina por “sus descubrimientos acerca del mecanismo de la replicación y estructura genética de virus”. El premio fue compartido con Delbrück y Luria. (ver Tabla I)
1955	Rosalind Franklin (1920-1958)	Lideró trabajos pioneros relacionados con la estructura del virus del mosaico de tabaco. Basándose en imágenes de J.D. Bernal e I. Fankuchen describe la estructura completa del virus. Propuso que el virus era hueco e hipotetizó que el RNA del virus era de hebra sencilla [157].
1955	Jonas Edward Salk (1914-1995)	Desarrolló la primera vacuna eficaz frente a la poliomielitis [38]; se denominó vacuna <i>Salk</i> .
1955	Heinz Fraenkel-Conrat (1910-1999) y Robley Cook Williams (1908-1995)	Demostraron que el RNA era el material genético del virus del mosaico del tabaco. Describieron que podría crearse un virus funcional a partir de RNA purificado y proteínas de la envoltura. En 1960 publican la secuencia de la proteína del mosaico del tabaco (158 aminoácidos).
1963	Baruch Samuel Blumberg (1925- )	Identificó el virus de la hepatitis B y, posteriormente, desarrolló una vacuna. Fue premio Nobel de Medicina o Fisiología en 1976 junto con D. Carleton Gajdusek (1923-2008) “por sus descubrimientos relacionados con nuevos mecanismos para el origen y diseminación de enfermedades infecciosas”.

Año*	Investigador	Descubrimiento
1969	Max Ludwig Henning Delbrück (1906-1981), Alfred Day Hershey (1908-1997) y Salvador E. Luria (1912-1991)	Trabajos sobre los bacteriófagos, mecanismo de replicación de los virus y su estructura genética, y sobre la implicación de la mutación genética en la resistencia bacteriana. Recibieron el premio Nobel de Medicina o Fisiología en 1969 por “sus descubrimientos acerca del mecanismo de la replicación y estructura genética de virus” [158].
1965-1970	David Baltimore (1938-), Howard M. Temin, (1934-1994) y Renato Dulbecco (1914-)	Descubrimiento de retrovirus, de la transcriptasa inversa (que transcribe el RNA a DNA) en retrovirus y la propuesta de que los virus pueden desempeñar un papel destacado en la génesis del cáncer [159-161]. En 1975 recibieron el premio Nobel de Medicina o Fisiología por “sus descubrimientos acerca de la interacción de virus oncogénicos y el material genético de la célula”.
1976	John Michael Bishop (1936-) y Harold E. Varmus (1939-)	Demuestran que los oncogenes virales proceden de proto-oncogenes celulares transformados [162]. Con sus hallazgos se pudo comprender la producción de tumores malignos a partir de cambios que se producen en genes normales de una célula, que no sólo son producidos por virus, sino que también pueden ser producidos por radiaciones, sustancias químicas, etc. Recibieron el premio Nobel de Medicina o Fisiología en 1989 por “el descubrimiento del origen celular de los oncogenes retrovirales”.
1982	William J. Rutter (1928-), Bejamin D. Hall y Maurice R. Hilleman (1919-2005)	Obtención de la primera vacuna recombinante contra la hepatitis B obtenida en levadura [163, 164]. Colaboración con los laboratorios de investigación virológica de la compañía Merck y, posteriormente, con la compañía Chiron Corp, fundada por Rutter.
1982	Aaron Klug (1926- )	Desarrollo de la microscopía electrónica cristalográfica para observar estructuras víricas, por lo que le concedieron en 1982 el premio Nobel de Química por “el desarrollo de métodos cristalográficos para descifrar los complejos proteínicos de los ácidos nucleicos”.
1983-1986	Luc Montagnier (1932-)	L. Montagnier con su equipo, del que formaba parte Françoise Barré-Sinoussi, en el Instituto Pasteur para investigar la entidad patológica responsable del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) aísla en 1983 el primer virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Robert Gallo (1937- ) lo describe en 1984. Ese año Montagnier caracteriza biológicamente y molecularmente al virus y confirma al VIH como agente causante del SIDA. En 1985 describen un test para detectar en sangre anticuerpos del virus y en 1986 aíslan el segundo virus VIH-2. Junto con Harald zur Hausen (1936-) y Françoise Barré-Sinoussi (1947-) recibe el premio Nobel de Medicina o Fisiología en 2008 por “el descubrimiento del virus de la inmunodeficiencia humana” [165, 166].
1988	George H. Hitchings (1905-1998) Gertrude Belle Elion (1918-1999)	Describieron drogas útiles para el tratamiento de enfermedades como la leucemia, los desórdenes autoinmunes, la malaria, las infecciones bacterianas y las infecciones virales (entre otros, aciclovir para tratar los herpesvirus o azidotimidina frente al VIH). Junto a Sir James W. Black (1924-2010) reciben el premio Nobel de Medicina o Fisiología en 1988 por “el descubrimiento de principios importantes para el tratamiento con fármacos”.
1996	Peter Charles Doherty (1940- ) y Rolf M. Zinkernagel (1944-)	Recibieron el premio Nobel de Medicina o Fisiología en 1996 por “sus descubrimientos sobre la respuesta inmunitaria de las células frente al ataque de organismos infecciosos”, concretamente por sus hallazgos sobre cómo el sistema inmunitario reconoce a células infectadas por virus.

Año*	Investigador	Descubrimiento
1998	Andrew Z. Fire (1959-) y Craig C. Mello (1960-)	Proponen un mecanismo dependiente de una secuencia específica para la silenciación post-transcripcional de genes. Ésta se inicia por un dsRNA análogo que contiene alguna secuencia semejante a la del mRNA del gen cuya actividad va a ser suprimida [167]. Recibieron el premio Nobel de Medicina o Fisiología en 2006 por “el descubrimiento del RNA de interferencia-silenciación génica por RNA de doble cadena”.
<b>SIGLO XXI</b>		
2003	Kang-Sheng Li, Yue Guan y colaboradores	En Asia se detectan casos de la gripe aviar producida por el subtipo HPAI A (H5N1) del virus Influenza A, que puede transmitirse al hombre [168, 169].
2008	Harald zur Hausen (1936-)	Recibió el premio Nobel de Medicina o Fisiología en 2008 (junto a Françoise Barré-Sinoussi y Luc Montagnier) por “el descubrimiento de que el virus del papiloma humano causa el cáncer cervical”. Este descubrimiento ha permitido el desarrollo de una vacuna frente a esta enfermedad.
2009	Yasushi Itoh y colaboradores	Caracterización <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> del virus de la gripe A de la cepa H1N1 ( <i>Orthomyxoviridae</i> ) responsable del brote de gripe porcina detectado en México [170].

(\*) El año indicado puede hacer referencia a la fecha del descubrimiento, al año de publicación de los resultados, o bien a la concesión del premio Nobel.

Virología. En ella también se incluyen los descubrimientos y trabajos que han permitido a algunos de los investigadores ser galardonados con los premios Nobel por sus contribuciones a la elucidación de la naturaleza química del material genético de los virus, descripciones de nuevos virus, a su estudio genético, a las bases moleculares de su replicación y, en último término, a la elaboración del concepto moderno de virus así como al desarrollo de agentes antivirales [171-174]. Como se ha comentado para la Tabla I, otros nombres deberían ser incorporados pero la selección está basada en criterios personales y en los límites que impone un tema amplio como el aquí presentado. El número de publicaciones desde mediados del siglo XX y lo que llevamos de este siglo sobre este tema es abrumador e imposible de recopilar. Las cifras reflejan el exhaustivo número de publicaciones que incluyen el término virus en los años 2007, 2008, 2009 y el primer trimestre del 2010 son, respectivamente, 29.521, 30.643, 31.694 y 9.389, y el de las que contienen el término antiviral 4.658, 4.579, 4.940 y 1.378. Frederick A. Murphy, de la Universidad de Texas, ha recopilado datos sobre los hechos y descubrimientos sobre los que se fundamenta la Virología (desde el año 400 a.C. hasta el año 2008); estos datos se pueden con-

sultar en la página web <http://www.utmb.edu/ihii/virusimages/index.shtml>.

Los comentarios que a continuación se presentan son simplemente algunos de los apuntes que se podrían seleccionar. Los efectos de los microorganismos como agentes causantes de enfermedades se conocían desde la antigüedad, como por ejemplo la manifestación de la enfermedad de la rabia. Una de las descripciones de la rabia que realiza Celso, médico del siglo I, en su libro *De medicina*, es: “Especialmente en el caso en que el perro esté rabioso, el virus debe ser drenado con una ventosa de vidrio.”, aunque aquí el significado del término *virus* es veneno. Así, aunque los virus no son un fenómeno moderno, desde mediados del siglo XX el conocimiento sobre sus propiedades biológicas, químicas y físicas ha avanzado considerablemente. En 1939 se publica la primera revista científica dedicada exclusivamente a la Virología (*Archives of Virology*) y en 1953 Salvatore Luria publica el primer texto de *General Virology*. Desde el descubrimiento en 1892 de los virus filtrables, y paralelo al desarrollo tecnológico, se produce un despegue entre los años 1950-1960 que llega hasta lo que en nuestros días es la moderna Virología [175]. Un hecho histórico da

cuenta de la repercusión que pueden tener las epidemias. Se ha propuesto que la conquista del Imperio Azteca de México por Hernán Cortés pudo ser posible porque una epidemia de viruela destruyó la ciudad de México; el virus pudo llegar con las tropas de relevo enviadas a Hernán Cortés en 1520. Además, las consecuencias devastadoras de la viruela en las colonias españolas fue tan grande que, en 1803, el Rey Carlos IV organizó lo que se denominó la Real Expedición Filantrópica de la Vacuna, conocida como Expedición Balmis, que duró más de diez años. Ésta se gestó por los consejos que recibió Carlos IV del médico de la corte Francisco Javier de Balmis, que conocía los trabajos de Jenner y que abogaba por una vacunación masiva de niños a lo largo del imperio y en todos los dominios de Ultramar. Para que la vacuna resistiese en perfecto estado todo el trayecto, llevaron en el viaje a niños que se iban pasando cada cierto tiempo la vacuna de uno a otro mediante el contacto de las heridas. El impacto de la viruela y su vacuna fue tal, que en 1805 se promulga una Real Cédula por la que se mandaba que en todos los hospitales se destinase una sala para conservar el fluido vacuno.

El desarrollo de la Virología fue lento dadas las dificultades que presentó el cultivo de los virus. A diferencia de las bacterias y otros microorganismos, los virus son incapaces de multiplicarse en los medios de cultivo, requieren infectar a una célula viva (células de mamíferos, plantas, hongos o bacterias) como hospedadora para proliferar y producir nuevas partículas víricas (viriones). Inicialmente se recurrió a un método indirecto de trabajo, a la experimentación con animales y plantas para reproducir enfermedades virales; ello también fue aportando información sobre las propiedades y la naturaleza de los virus. A finales del siglo XIX, los virus eran definidos en términos de su filtrabilidad, infectividad y su necesidad de huéspedes vivientes, pero sólo podían multiplicarse en plantas y animales.

Las técnicas de cultivo celular han sido, y son, un instrumento valioso en el proceso de propagación de virus y un soporte inestimable para la investigación en Virología. Al desarrollarse la metodología del cultivo celular, inicialmente cultivo de fragmentos de tejidos y posteriormente de células, se pudieron utilizar estas técnicas para la propagación de los virus. Las dificultades técnicas se fueron subsanando a principios del

siglo XIX con Alexis Carrel (premio Nobel de Medicina o Fisiología en 1912 por su trabajo en sutura vascular y trasplante de órganos), quien estableció los principios del cultivo de tejidos. Además, fijó las bases de una técnica aséptica para prevenir las contaminaciones de los cultivos por microorganismos, los cuales se multiplican rápidamente destruyendo el tejido y agotando los nutrientes requeridos para su crecimiento. En 1907, Ross Glanville Harrison, considerado como el padre del cultivo de tejidos, desarrolló un método para cultivar tejidos en linfa [144]. Steinhardt, Israeli y Lambert en 1913 [146], utilizaron este método para cultivar el virus vaccinia en fragmentos de tejido corneal de cobaya. Posteriormente quedó demostrado que los virus podían multiplicarse en cultivos de tejidos y de células, lo que permitió la obtención de virus y su purificación para la obtención de vacunas; los cultivos también se utilizan para obtener virus mutados. En 1925 Frederick Parker y Robert N. Nye publicaron el cultivo del virus vaccinia y del herpes [176, 177] y en 1928, Hugh B. Maitland y Mary C. Maitland cultivaron virus vaccinia en suspensiones de riñones troceados de gallina [148], aunque su método no fue adoptado hasta 1950 cuando se empezó a cultivar poliovirus a gran escala para la producción de vacunas. Otro avance se produjo en 1931, cuando Ernest William Goodpasture cultivó el virus de la gripe y otros virus en huevos fertilizados de gallina [149]. Uno de los primeros virus considerados y más estudiados, desde 1892 por Dimitri Ivanovsky [140] hasta mediados del siglo XX, ha sido el virus del mosaico del tabaco, que fue cristalizado por Wendell M. Stanley en 1935 [151], describiéndose poco después su composición en proteínas y ácidos nucleicos, obteniéndose las primeras imágenes por difracción de rayos X y determinándose su estructura en detalle.

Una nueva época en la historia de la investigación del virus se inicia en 1949 cuando John Enders, Thomas Weller y Frederick Robbins consiguieron propagar con éxito del virus de la poliomielitis en los cultivos de células no neuronales, siendo la primera vez que se cultivaba un virus sin utilizar tejidos animales sólidos o huevos fertilizados [155], recibiendo los tres el premio Nobel de Medicina o Fisiología en 1954 por estos descubrimientos. En la concesión del premio Nobel se mencionó la importancia de estos cultivos para la producción de vacunas. En realidad, fue la primera oportunidad para producir virus inactivados,

lo que permitió a Jonas E. Salk generar una vacuna efectiva contra la poliomielitis en 1955 [38]. Fue uno de los primeros ejemplos de virus producidos en masa usando técnicas de cultivos celulares; los virus fueron cultivados en células Vero y, posteriormente, se inactivan con formol. A pesar de la importancia de este descubrimiento, las contribuciones de Salk y Sabin al desarrollo de vacunas contra la polio no fueron reconocidas con un premio Nobel [178].

La segunda mitad del siglo XX es, hoy por hoy, considerada como la edad de oro de la Virología; se reconocieron más de 2.000 virus que infectan a especies animales, a plantas y a bacterias. Actualmente en las condiciones adecuadas se pueden generar virus enteros, virus recombinantes o productos virales en células diferentes a los hospedadores naturales. Algunos hitos importantes durante estos años fueron los descubrimientos del arterivirus equino y del pestivirus que causa la diarrea bovina (1957), y del virus B de la hepatitis por Baruch Blumberg (1963). En 1965, Howard Temin describe el primer retrovirus [160]. La transcriptasa inversa, que convierte el RNA en DNA, la enzima clave de los retrovirus, se describe en 1970 independientemente por Howard Temin y David Baltimore [159, 161]. Los dos compartieron el Premio Nobel de Fisiología o Medicina en 1975, con Renato Dulbecco, por su descubrimiento. En 1983 el laboratorio de Luc Montagnier aísla el retrovirus VIH [165]. Otro de los virus estudiados ha sido el virus humano del papiloma (familia de virus heterogénea) que ya desde su descubrimiento se postuló su posible papel en el carcinoma de cuello de útero (cáncer cervical) y en otros tipos de cáncer anogenitales, de cabeza y cuello, así como cutáneos. Los tipos 16 y 18 se identificaron en 1983 y se elaboraron vacunas frente a ellos como primera medida preventiva; el 16 está presente en el 50% de las biopsias de cáncer cervical y el 18 en el 20% [179]. Estos estudios también fueron premiados con el Nobel en Medicina y Fisiología en el 2008 a Harald zur Hausen.

La investigación sobre los mecanismos de enfermedades causadas por infecciones virales permitió la elucidación de su patogénesis así como el desarrollo de métodos novedosos de diagnóstico basándose en técnicas de Biología Molecular e Ingeniería Genética. Ello, a su vez, facilitó la identificación de nuevos tipos de virus a partir de los años 80 del siglo pasado. Al

progreso contribuyeron las diferentes técnicas de microscopía electrónica, la difracción de rayos X y los análisis bioquímicos e inmunológicos. Entre los hechos sobresalientes destaca la invención del microscopio electrónico en 1931 por Ernst Ruska y Max Knoll que permitieron disponer de las primeras imágenes de los virus [150], las primeras imágenes por difracción de rayos X obtenidas por Bernal y Fankuchen en 1941 [153, 154] y las de Rosalind Franklin, quien describió la estructura completa de un virus en 1955 [157]. Por otro lado, los cultivos celulares continúan aún hoy adaptándose a los requerimientos de la investigación sobre el crecimiento de virus, su patogénesis, las interacciones virus-célula huésped, y para el análisis de la eficacia de agentes antivirales. A modo de ejemplo, se utilizan cultivos organotípicos tridimensionales de células de epitelio, modelo que reproduce el proceso de diferenciación de los queratinocitos y que refleja la situación *in vivo*, con el fin de conocer más a fondo el proceso de patogénesis de virus (como el papillomavirus, herpesvirus y parvovirus) que infectan los epitelios [180].

## ANTIVIRALES

Aunque frente a algunos virus hay vacunas que son efectivas, en muchos casos se requiere una terapia antiviral, por lo que el desarrollo de fármacos antivirales es un requisito imprescindible en la lucha frente a los virus. Sin embargo, la obtención de fármacos antivirales para erradicar las infecciones virales es más difícil que la de los antibióticos, ya que los virus, para reproducirse, necesitan utilizar la maquinaria biosintética de las células que infectan. Por ello, la quimioterapia antivírica afronta importantes obstáculos, como por ejemplo la selectividad del compuesto con una citotoxicidad reducida para la célula huésped e inhibir específicamente una o más etapas del ciclo replicativo de los virus. Esto supone buscar un blanco vulnerable entre los procesos y moléculas que participan en el ciclo vital viral. Otro problema adicional es disponer de un sistema modelo para poder evaluar las nuevas drogas. Al igual que en el caso de los antibióticos, y dado que también se han descrito resistencia a algunos fármacos antivirales y transmisión de virus resistentes a drogas, el desarrollo de nuevos compuestos no cesa. La revista *Antiviral Research* ha dedicado un número especial (enero de 2010; “Twenty-five years of anti-

**TABLA VI: Agentes quimioterapéuticos activos contra los virus****Anticuerpos**

Anticuerpo monoclonal humanizado (Palivizumab): neutraliza la adsorción viral (virus respiratorio sincitial).

**Receptores solubles**

CD4 recombinante soluble: se comporta como un inhibidor competitivo del receptor celular de la proteína gp120 del VIH. Inhibe la adhesión del virus a la célula. (VIH)

CD4-IgG (PRO542): forma tetramérica del antígeno CD4 soluble recombinante fusionado a una inmunoglobulina para aumentar su estabilidad; tiene una alta afinidad por la proteína gp120. Inhibidor competitivo (VIH)

**Péptidos modificados**

Enfuvirtide (T-20): péptido inhibidor de la fusión por interacción con la proteína transmembrana viral gp41, que está implicada en la formación del poro en la membrana de la célula infectada.

**Análogos de nucleósidos y nucleótidos**

Inhibidores de la DNA polimerasa viral. Se incorporan al DNA que se está biosintetizando y provocan la terminación de la cadena:

Ganciclovir: análogo de 2'-desoxiguanosina [9-(1,3-dihidroxi-2-propoximetil) guanina] (citomegalovirus)

Cidofovir: análogo de la desoxicitidina monofosfato [1-(3-hidroxi-2-fosfonilmetoxi)propil] citosina].

Requiere la formación *in vivo* del difosfato de cidofovir. Activo frente a un amplio espectro de virus DNA como citomegalovirus.

Antirretrovirales. Inhibidores de la transcriptasa inversa. Se incorporan al DNA que se está biosintetizando y provocan la terminación de la cadena:

Aciclovir: análogo de guanosina [9-(2-hidroxietoximetil) guanina] (virus herpes humano)

Ribavirina: análogo de 2'-desoxiguanosina [1-(β-D-Ribofuranosil)-1,2,4-triazol-3-carboxamida]. Amplio espectro de actuación antirretroviral y frente a virus DNA.

Zidovudina (AZT): análogo de timidina (3'-azido-2',3'-dideoxitimidina). Primer antirretroviral aprobado por la FDA frente al VIH (1987).

Didanosina, didesoxiinosina o ddI: análogo de inosina (2',3'-didesoxiinosina). Segundo antirretroviral aprobado por la FDA frente al VIH (1991).

Zalcitabina (ddC): análogo de 2'-desoxicitidina (2',3'-didesoxicitidina) Tercer antirretroviral aprobado por la FDA frente al VIH (1992).

Estavudina (d4T): análogo de timidina (2',3'-dideshidro-3'-desoxitimidina) Cuarto antirretroviral aprobado por la FDA frente al VIH (1994).

Lamivudina (3TC): análogo de citidina (2',3'-didesoxi-3'-tiacitidina). Requiere la formación de la forma trifosfato. Empleado frente al virus de la hepatitis B y quinto antirretroviral aprobado por la FDA frente al VIH (1995).

Tenofovir: análogo de la adenina 5'-monofosfato (nucleósido fosfonato acíclico). Se emplea bajo la forma disoproxil fumarato que se transforma en el organismo a tenofovir. Antirretroviral aprobado por la FDA frente al VIH (2001).

**Aminas sintéticas**

Amantadina (amina primaria tricíclica) y rimantadina: bloquean la penetración del virus y la pérdida de la cubierta de las partículas virales (descapsidación del virus) (virus gripe A).

**Análogos de fosfato**

Ácido fosfonofórmico (foscarnet): inhibidor de la transcriptasa inversa y de las DNA polimerasas virales por unión al sitio del pirofosfato. Activo frente a retrovirus (VIH) y virus DNA (citomegalovirus y otros herpesvirus).

**Inhibidores no nucleosídicos de la transcriptasa inversa**

Nevirapina: [1-ciclopropil-5,11-dihidro-4-metil-6H-dipirido(3,2-b:2',3'-e)(1,4) diazepin-6-ona]. Primer inhibidor no análogo de los nucleósidos aprobado por la FDA frente al VIH-1 (1996).

**Inhibidores de la proteasa**

Inhiben a la proteasa del VIH implicada en el procesamiento de la poliproteína.

Saquinavir: primer fármaco de este tipo aprobado por la FDA frente al VIH (1995).

Ritonavir e indinavir: aprobados por la FDA en 1996.

## Inhibidores de la integrasa

Bloqueo de la integración del material genético viral en los cromosomas humanos (VIH). Raltegravir o MK-0518: antirretroviral aprobado por la FDA frente al VIH (2007).

## Interferones

Actúan en dos niveles: por un lado induce proteínas que inhiben la replicación vírica en células aún sanas y, por otro lado, favorece la destrucción de las células ya infectadas por los linfocitos NK (*Natural Killer*).

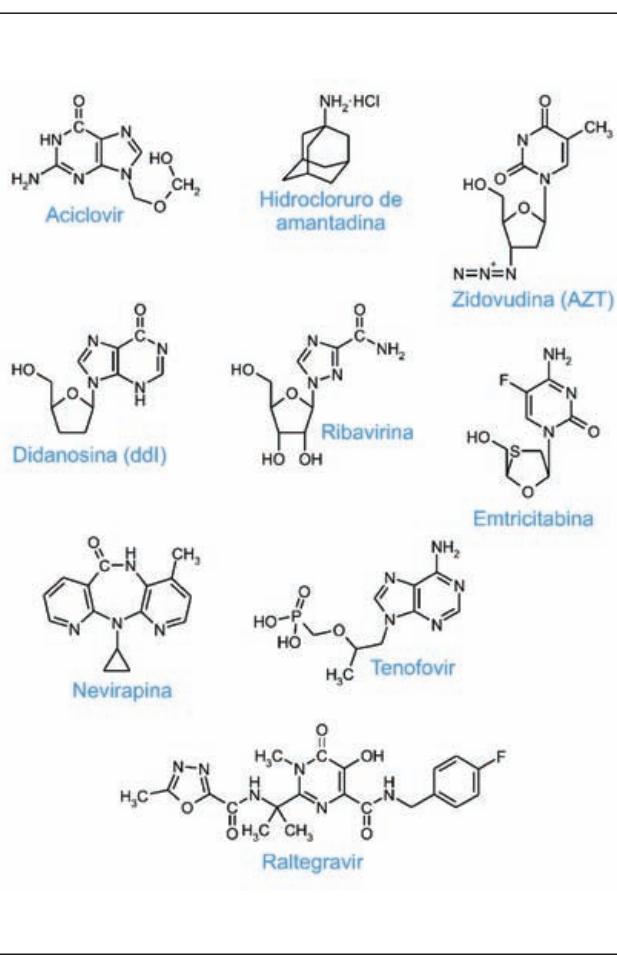
Interferón  $\alpha$ : se ha empleado para el tratamiento de la hepatitis B y C y en algún caso de infección por el virus del papiloma.

Interferón  $\beta$ : se ha ensayado su efecto sobre coronavirus causantes de SARS (Síndrome Respiratorio Agudo Severo) y sobre algunos herpesvirus.

## RNA antisentido

Formivirsen: oligonucleótido antisentido de 21 nucleótidos con enlaces fosforotioato resistentes a nucleasas. Bloquea la traducción del mRNA viral. Fue el primer antiviral de este tipo aprobado por la FDA (1998). Utilizado sobre todo frente a retinitis causada por citomegalovirus.

FDA: "Food and Drug Administration" de los EEUU



**Figura 12. Estructuras de diferentes fármacos antivirales.** Se recogen las fórmulas de diferentes fármacos antivirales, inhibidores enzimáticos de la transcriptasa inversa análogos de nucleósido (aciclovir, didanosina, zidovudina o AZT, ribavirina y emtricitabina), no nucleosídicos (neviparina), aminas sintéticas (hidrocloruro de amantadina), análogos de nucleótidos (tenofovir) e inhibidores de la integrasa (raltegravir).

*retroviral drug development: progress and prospects")* a los hitos en la investigación, desarrollo y terapia antirretroviral con motivo del 25 aniversario del descubrimiento de este tipo de drogas [172].

En la Tabla VI se recogen algunos de los agentes quimioterapéuticos activos contra los virus en función de su naturaleza, del proceso que bloquean y algunos ejemplos de virus sobre los que son efectivos. En la Figura 12 se muestran estructuras de diferentes fármacos antivirales como algunos análogos de nucleósido que inhiben a la transcriptasa inversa (aciclovir, didanosina, zidovudina o AZT, ribavirina y emtricitabina), un análogo no nucleosídico (nevirapina), una amina sintética (hidrocloruro de amantadina), un análogo de nucleótido (tenofovir) y un inhibidor de la integrasa (raltegravir). Algunos de estos fármacos pueden utilizarse en una terapia combinada si no hay interacciones entre ellos, consiguiéndose una mayor efectividad del tratamiento.

El primer fármaco antiviral aprobado en 1963, y utilizado en el tratamiento tópico del virus del herpes simple y zoster, fue la idoxuridina. Es un análogo de timidina que inhibe la síntesis de DNA. Es poco específica ya que inhibe tanto la replicación del DNA viral como la del DNA de la célula huésped. El aciclovir (2-amino-9-(2-hidroxietoximetil)-3H-purin-6-ona) es un análogo de la guanosina que, a diferencia de otros análogos de nucleósidos, no contiene el anillo de desoxirribosa. Fue descubierto en 1974 por Howard Schaeffer y Lilia Beauchamp y, a principios de los años 80, fue una de las primeras drogas antivirales

selectivas y poco citotóxicas. Es activa frente al herpes simple e inhibe la replicación del DNA. Gertrude Belle Elion, por el desarrollo de derivados del aciclovir [181, 182], junto a George H. Hitchings y James W. Black, recibió el premio Nobel de Medicina o Fisiología en 1988 por “el descubrimiento de principios importantes para el tratamiento con drogas”. El aciclovir, al igual que otros análogos de nucleósidos, debe activarse intracelularmente; se fosforila por una timidina quinasa viral y esta forma monofosfato es convertida a trifosfato por quinasas celulares. Las formas trifosfato son los sustratos que utilizan las DNA polimerasas para incorporar los nucleótidos al DNA. El modo de acción de los inhibidores análogos de nucleósidos y nucleótidos se basa fundamentalmente en que se incorporan a la cadena de DNA que se está biosintetizando pero, al carecer de la desoxirribosa o del grupo hidroxilo en la posición 3', no se puede continuar la elongación de la dicha cadena por lo que ésta finaliza en el punto donde se ha incorporado el antiviral.

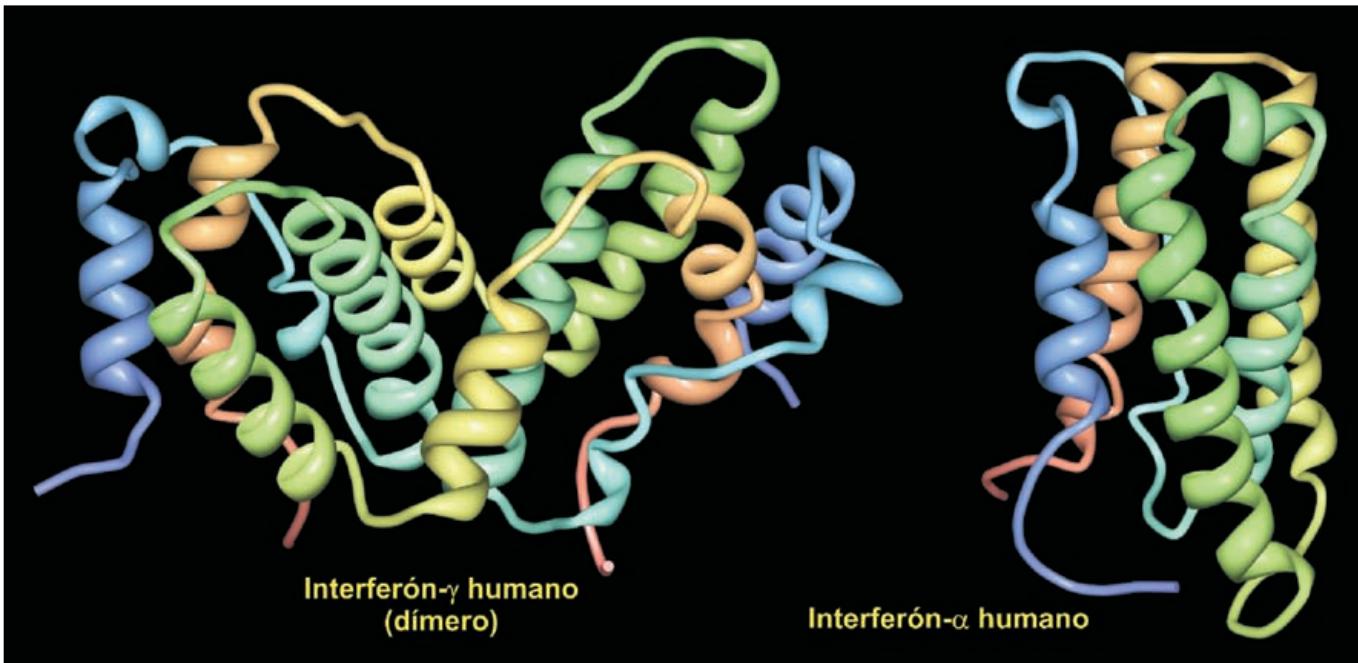
Entre los inhibidores análogos de nucleósidos y nucleótidos hay moléculas que inhiben a la DNA polimerasa viral; un gran grupo de ellos inhibe específicamente a la transcriptasa inversa, los denominados retrovirales, cuya utilización se ha ido aprobando sucesivamente. Entre los retrovirales también se encuentra el foscarnet (análogo del pirofosfato) con un mecanismo de acción diferente; interacciona en el sitio de unión del pirofosfato (producto que se obtiene tras la incorporación de un nucleótido en el proceso de replicación) y, al bloquear dicha posición, no puede producirse la incorporación de otro nuevo nucleótido. Aunque compite con el pirofosfato, la inhibición global ejercida sobre las transcriptasas inversas virales y sobre las DNA polimerasas del virus del herpes simple y del citomegalovirus es de tipo no competitivo con respecto a los desoxinucleótidos [183].

Para inhibir las primeras etapas del ciclo vital del virus se fueron descubriendo diversas moléculas. El palivizumab, que neutraliza la adsorción del virus, es un anticuerpo monoclonal obtenido por la tecnología del DNA recombinante que es efectivo frente al virus respiratorio sincitial. Además, se pueden utilizar moléculas recombinantes que compiten con el receptor celular por su unión al virus, como el CD4 recombinante o el complejo CD4-IgG2, o un péptido inhibidor de la fusión del virus a la célula porque interacciona

con alta afinidad con una proteína viral (la gp120 del VIH) bloqueando la unión del virus al receptor de superficie celular. Este es el caso del enfuvirtide o T-20 cuyo desarrollo se empezó en 1996 y se aprobó por la FDA en 2003 como la nueva clase de drogas antirretrovirales que inhiben la fusión del VIH. Otro mecanismo de acción de los antivirales es el bloqueo de la formación de la cápsida viral como ocurre con la amantadina, una amina sintética, que es efectiva frente al virus de la gripe A. Una de las últimas etapas del ciclo vital de un virus la bloquea el oseltamivir o tamiflú, que es un profármaco antiviral (se activa por acción de las esterasas) selectivo contra el virus de la gripe; actúa inhibiendo a las neuraminidasas que participan en la liberación del virus de las células infectadas para su diseminación.

También se han descrito inhibidores de la proteasa del virus VIH; la proteasa se encarga de procesar la poliproteína sintetizada, rindiendo las proteínas necesarias para el ensamblaje de las partículas virales, para la replicación y para la maduración del virus. El saquinavir fue el primero de los fármacos de este grupo que se aprobó: éstos mimetizan los sitios de ruptura de la poliproteína compitiendo por la unión a la proteasa. Por otro lado, el raltegravir es el primer inhibidor descrito de la integrasa [184], tolerado en pacientes resistentes a otros antivirales y que se puede utilizar en terapias combinadas porque no presenta interacciones droga-droga. En este caso, el proceso que se altera es la integración del DNA viral en los cromosomas de la célula huésped por lo que el genoma viral no puede replicarse.

Otra estrategia para eliminar los virus consiste en activar al sistema inmunológico, produciendo inmuno-moduladores, moléculas que modifican la respuesta inmune del huésped. El sistema inmunológico constituye la principal defensa que poseen los animales superiores para protegerse de las infecciones y de todo aquello que sea ajeno al organismo; discrimina entre lo propio y lo ajeno. La inmunidad natural o innata es la primera barrera de defensa y está formada por las barreras físico-químicas (como la piel, las membranas mucosas, la lisozima o el ácido clorhídrico del jugo gástrico), moléculas circulantes (proteínas del sistema de complemento), células [células fagocitarias como macrófagos o neutrófilos y las células asesinas naturales (NK, *Natural Killer*)] y mediadores solubles



**Figura 13. Estructura del interferón.** Estructura tridimensional de las moléculas de interferón- $\gamma$  (forma dimérica; basado en el fichero PDB 1FG9) [190] e interferón- $\alpha$ 2 (forma monomérica; PDB 2HYM) [191], ambas de origen humano. La figura se ha creado utilizando el programa PDB ProteinWorkshop v3.7 [104].

activos sobre otras células (citoquinas producidas por macrófagos o el interferón  $\alpha$  y el  $\beta$ ).

El interferón se descubrió en 1957 por Alick Isaacs y Jean Lindenmann [185] y parecía que iba a ser la panacea frente a las infecciones virales, como lo fue la penicilina frente a las infecciones bacterianas. El hecho de que se pudiese inducir la expresión de interferón por RNA de doble cadena, como el poli(I). poli(C) sintético, tuvo un gran impacto por ser un mecanismo de defensa natural frente a infecciones víricas en las que aparece RNA de doble cadena [174, 186]. El interferón actúa incrementando la expresión de diferentes genes generando el denominado “estado antiviral” [187]. Considerando tan sólo la inducción de dos proteínas se puede explicar parte de su potencial antiviral. El interferón induce la expresión de la proteína quinasa dependiente de RNA de doble cadena (PKR o eIF-2 quinasa), que fosforila a la subunidad  $\alpha$  del factor de iniciación eucariótico eIF-2. Al fosforilarse este factor, se bloquea su actividad y, consecuentemente, se inhibe la traducción del RNA mensajero de la poliproteína viral. Además, otra enzima que también se induce por interferón es la 2',5'-oligoadenilato sintetasa, la cual sintetiza el polinucleótido 2'p5' de adenosina que, a su vez, activa a la

ribonucleasa L degradando al RNA mensajero. Sin embargo, muchos virus desarrollan estrategias para contrarrestar e interrumpir estas vías de defensa; algunas proteínas virales antagonistas interfieren a diferentes niveles: secuestro del RNA de doble cadena, inhibición de la dimerización y activación de PKR, síntesis de pseudosustratos para PKR, o degradación de la PKR. El tipo de inhibición depende del virus considerado [188, 189]. De todas formas, se ha demostrado la actividad antiviral del interferón- $\alpha$  frente al virus de la hepatitis C en combinación con la ribavirina. El interferón- $\gamma$  no se induce por RNA de doble cadena pero potencia los efectos del interferón- $\alpha$  y del  $\beta$ . En la Figura 13 se muestra la estructura tridimensional de la forma dimérica del interferón- $\gamma$  [190] y de la forma monomérica del interferón- $\alpha$ 2 [191].

Otra forma de actuar frente a los virus, de analizar la respuesta de una célula infectada por un virus o de establecer correlaciones con la virulencia, se centra en los denominados microRNA. Éstos son una clase de RNA pequeños no codificantes que desempeñan un papel clave en la regulación de la expresión génica en etapas post-transcripcionales. Andrew Z. Fire y Craig C. Mello propusieron un mecanismo dependiente de una secuencia específica para la silenciación post-

transcripcional de genes. Esta regulación se inicia por un RNA de doble cadena análogo que contiene alguna secuencia semejante a la del RNA mensajero del gen cuya actividad va a ser suprimida [167]. En 2006 recibieron el premio Nobel de Medicina o Fisiología por “el descubrimiento del RNA de interferencia- y la silenciación génica por RNA de doble cadena”. Los microRNA modulan la función y estabilidad de los RNA mensajeros pero también pueden tener actividad antiviral afectando al ciclo vital de los virus. En los picornavirus se ha descrito que pueden promover la degradación del genoma viral, inhibir la biosíntesis de proteínas virales, e interferir en la encapsulación viral [192]. Los microRNA, tanto los humanos como los codificados en el genoma viral, prometen ser unas dianas en la terapia antiviral [193]. Ya hay evidencias que indican que microRNA de la célula huésped pueden representar un mecanismo de defensa antiviral actuando bien directamente sobre la expresión del genoma viral o bien a través del reconocimiento e inactivación de especies de RNA virales en la que participan componentes de la maquinaria de silenciación, como el complejo Dicer [194].

## EL VIRUS DE LA HEPATITIS C

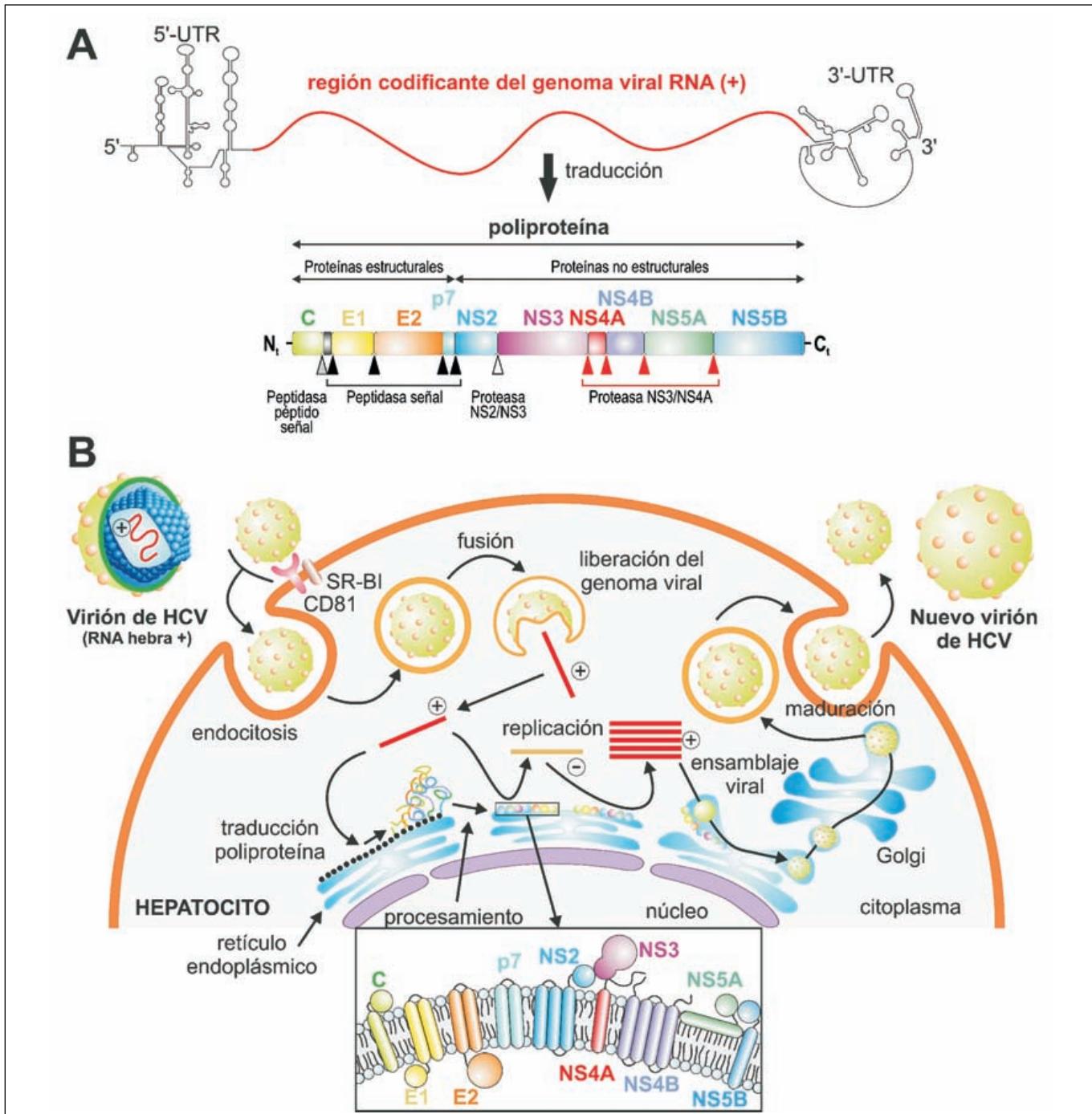
El virus de la hepatitis C es la principal causa de hepatitis aguda y enfermedad hepática crónica, incluyendo cirrosis y cáncer hepático [195]. Este virus utiliza mecanismos complejos y únicos para impedir, evadir y alterar la respuesta inmune innata y adaptativa, estableciendo una infección persistente y hepatitis crónica. La mayor parte de las personas infectadas (55-85%) se convierten en portadores crónicos, haciéndose persistente la presencia de virus detectables en suero. Según la Organización Mundial de la Salud, en la actualidad existen alrededor de 170 millones de personas infectadas por el virus en el mundo, un 3% de la población mundial, describiéndose cada año entre 3 y 4 millones de casos nuevos.

La superficie del virus de la hepatitis C se encuentra constituida por una envoltura de naturaleza lipídica en donde se encuentran las glicoproteínas estructurales E1 y E2, las cuales juegan un papel fundamental en las primeras etapas del ciclo infectivo del virus. La proteína p7 forma un canal iónico. La bicapa

lipídica recubre la nucleocápsida viral, formada por la proteína C, y dentro de ésta se aloja el genoma del virus. Dicho genoma fue clonado y secuenciado por primera vez en 1989, a partir del plasma de chimpancé infectado con el suero de un paciente con hepatitis C. Está constituido por una cadena sencilla de RNA(+) de aproximadamente 9.500 nucleótidos que posee dos regiones no codificantes en los extremos 5' y 3' (5'-NTR y 3'-NTR) que flanquean la región codificante del genoma (Figura 14A) [196]. El genoma posee un único marco de lectura abierto que codifica para una poliproteína que, posteriormente, es procesada para originar las proteínas estructurales (C, E1, E2 y p7) y no estructurales (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B) del virus (Figura 14A). Las proteínas son liberadas de la poliproteína por dos proteasas que se encuentran en el retículo endoplásmico.

En los últimos años se ha realizado un gran avance en el esclarecimiento de aspectos clave de las diferentes etapas del ciclo infectivo del virus de la hepatitis C. Aún a falta de ciertos aspectos por confirmar, se ha llegado a plantear un modelo básico (Figura 14B) para explicar el ciclo infectivo. Diversos tipos de receptores de la membrana del hepatocito, la célula diana del virus, pueden estar implicados en el reconocimiento de las glicoproteínas de la envoltura, E1 y E2. Se ha apuntado la participación esencial del receptor CD81, miembro de la superfamilia de las tetraspaninas, para todos los genotipos del virus que infectan hepatocitos. Sin embargo, debido a que CD81 está presente en muchos tipos celulares, no es probable que sea el único factor que determina el tropismo celular del virus. En segundo lugar, puede participar la glicoproteína de la membrana plasmática lSR-BI, que pertenece a la familia de receptores *scavenger* (“basureros o carroñeros”), los cuales se expresan en hígado. Se ha apuntado como un buen candidato a receptor del virus puesto que media la unión de una forma de E2 soluble con células hepáticas humanas [197]. Por último, se ha propuesto también la participación del receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDLr) [198]. Este receptor internaliza partículas lipoproteicas que contienen colesterol a través de vesículas recubiertas de clatrina que son liberadas en los endosomas ácidos.

Se han descrito distintos modelos de unión y entrada en la célula del virus de la hepatitis C [199] (Figura 14B). En la circulación sanguínea, las



**Figura 14. Organización del genoma del virus de la hepatitis C y modelo del ciclo infectivo.** (A) El genoma del virus está compuesto por las regiones no traducidas 5'-NTR y 3'-NTR, que flanquean el marco de lectura que se traduce en una poliproteína. Ésta se procesa dando lugar a las proteínas virales estructurales (C, E1, E2 y p7) y no estructurales (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B). Las flechas en la parte inferior de la poliproteína indican los sitios de procesamiento por proteasas celulares y virales. (B) Ciclo infectivo propuesto para el virus de la hepatitis C. Tras el reconocimiento por los receptores CD81 y SR-BI de la superficie del hepatocito, el virus es endocitado por la célula. La liberación del genoma se produce por un proceso de fusión de las membranas viral y endosomal inducido por las glicoproteínas de la envoltura del virus. A partir del material genético, RNA(+), se obtiene la poliproteína que se traduce por los ribosomas asociados al retículo endoplásmico. Además, a partir de la hebra RNA(+) se sintetiza el intermedio RNA(-) por el complejo de replicación formado por las proteínas NS3-NS5B. La hebra RNA(-) se utiliza como molde para la síntesis de nuevas cadenas de RNA(+). El RNA(+) interacciona con la proteína C para la formación de la nucleocápsida. Las nucleocápsidas se empaquetan en partículas virales en el retículo endoplásmico, y son exportadas a través del complejo de Golgi al exterior de la célula. En la parte inferior de la figura se recoge la disposición de las proteínas virales en la membrana del retículo endoplásmico.

partículas de virus pueden encontrarse con o sin envoltura viral, y unidas o no a lipoproteínas. Las diferentes formas del virus pueden usar diferentes receptores para su unión y entrada en la célula. Los viriones con envoltura pueden interaccionar con CD81 a través de E2, mientras que la interacción entre los viriones asociados a lipoproteínas y al receptor de LDL puede ser independiente de las glicoproteínas de la envoltura. SR-BI puede jugar un doble papel facilitando la unión vía E2 y a través de un mecanismo mediado por lipoproteínas. Tras la endocitosis de los viriones que contienen envoltura asociados a lipoproteínas, E2 puede interaccionar con CD81 o SR-BI. La siguiente etapa constituye la fusión de las membranas viral y celular y la liberación del genoma al citoplasma.

La replicación del virus de la hepatitis C se realiza en unas estructuras vesiculares denominadas red membranosa, cuya formación parece que es inducida por la proteína no estructural NS4B. Ésta se asocia al retículo endoplásmico de la célula infectada comportándose como una proteína integral de membrana orientada citoplasmáticamente. NS4B colocaliza con las proteínas no estructurales del virus NS3, NS4A, NS5A y NS5B, lo que sugiere que se trata de un componente del complejo de replicación viral [200]. El virus de la hepatitis C, al igual que otros virus RNA, utiliza proteínas celulares para su replicación. Con el fin de identificar estos factores, se han buscado proteínas celulares que interaccionen con la proteína NS5B. Así, se ha identificado la septina 6, implicada en la organización del citoesqueleto celular, la hnRNP A1, la cual está implicada en el transporte del RNA mensajero celular, o la ciclofilina A, que presenta actividad peptidil-prolil-isomerasa [201, 202]. Otro de los componentes integrante de la red membranosa es la proteína C (*HCV core protein*), que tiene un extremo C-terminal hidrofóbico responsable de la asociación de la proteína C con los dominios lipídicos y con la membrana del retículo endoplasmático [203].

Diversos estudios *in vitro* han demostrado que la proteína NS5B recombinante, expresada tanto en *E. coli* como en células de insecto, posee actividad RNA polimerasa dependiente de RNA y es responsable de la biosíntesis del genoma viral. Se ha propuesto que la replicación del virus tiene lugar a través de la biosíntesis de una cadena completa de RNA(-), probable-

mente por un mecanismo en el cual la región 3' NTR actuaría como cebador [204].

En la etapa del ensamblaje viral, los virus con envoltura adquieren ésta a partir de una de las diversas membranas de la célula hospedadora. La posibilidad recientemente abierta de propagar el virus en células de hepatoma humano ha revelado el papel esencial de los depósitos lipídicos y de la proteína C viral en el ensamblaje del virus. Esta proteína interacciona con dichos depósitos y los dirige hacia el complejo de replicación viral situado en la membrana del retículo endoplásmico posibilitando así el ensamblaje [205]. Además, la estricta retención de las glicoproteínas del virus (E1 y E2) en el retículo endoplásmico sugiere que el ensamblaje de las partículas virales tiene lugar en este compartimento [206]. La etapa de ensamblaje se ha estudiado también en otros virus, como el virus semliki, el virus de la estomatitis vesicular o el virus de la gripe. Las proteínas de la envoltura son sintetizadas y transportadas a la membrana plasmática del mismo modo que otras proteínas celulares. La acumulación de estas proteínas en la membrana induce el ensamblaje de las partículas virales [207, 208]. Otros virus se empaquetan en membranas celulares internas como el retículo endoplásmico (rotavirus; mecanismo parecido al virus de la hepatitis C) [209], el compartimento intermedio entre el retículo endoplásmico y el Golgi (coronavirus) [210] o el aparato de Golgi (bunyavirus) [211]. Como resultado, las partículas virales son liberadas de la célula infectada bien mediante lisis celular (rotavirus), o mediante el transporte de los virus en vesículas a la superficie celular y la fusión de éstas con la membrana plasmática (coronavirus y bunyavirus). En los virus cuyo ensamblaje tiene lugar intracelularmente, es necesaria una acumulación de las proteínas que forman la envoltura, por medio de secuencias señal específicas de retención en el compartimento celular adecuado, como ocurre con el virus de la hepatitis C.

Las únicas terapias útiles disponibles en la actualidad frente a la infección por el virus de la hepatitis C son el interferón- $\alpha$ 2b (IFN- $\alpha$ ) y la terapia combinada de interferón- $\alpha$  y ribavirina. También se ha desarrollado el interferón “pegilado”, en el que se une covalentemente polietilenglicol (PEG) al interferón- $\alpha$ , aumentando tanto su tiempo de vida media como el perfil fármaco-cinético y la velocidad de respuesta

[212]. Sin embargo, sólo un 10-20 % de los pacientes responden al tratamiento con IFN- $\alpha$  y entre un 30-40% a la terapia combinada [213]. Se ha sugerido que la resistencia intrínseca a la terapia con interferón en pacientes con infección crónica por el virus del genotipo 1 podría explicarse, al menos en parte, por la interacción de una proteína de la envoltura viral (E2) o de ES5A con la proteína quinasa dependiente de RNA de doble cadena (PKR). Esta quinasa es inducida por interferón- $\alpha$  y bloquea la traducción de la poliproteína viral; la interacción con E2 o con ES5A inhibe a PKR y disminuye los efectos del interferón- $\alpha$ . Además, se ha comprobado que NS5A es capaz de inducir la expresión de la citoquina IL-8, que inhibe los efectos antivirales del interferón- $\alpha$  posiblemente a nivel post-traduccional [213]. Puesto que no se trata de un tratamiento altamente específico para el virus de la hepatitis C y, además, es muy costoso, es necesario conocer los mecanismos moleculares que tienen lugar en la infección por dicho virus con el fin de localizar nuevas dianas terapéuticas para el diseño de fármacos antivirales.

Actualmente se están investigando agentes antivirales de acción directa sobre distintas dianas del virus de la hepatitis C (*STAT-C: Specifically Targeted Antiviral Therapy for hepatitis C*). Estas investigaciones se encuentran en fases clínicas I-III. Los compuestos más prometedores son el *telaprevir* y el *boceprevir*, ambos en fase II, que son inhibidores de la proteasa NS3/4A; los resultados de tratamientos combinados con interferón- $\alpha$  pegilado y ribavirina son positivos incluso en pacientes con resistencia al tratamiento estándar. También se están ensayando inhibidores de la polimerasa NS5B, aunque la eficacia antiviral es menor [214]. Por el momento, estos compuestos STAT-C sólo se analizan en combinación con ribavirina e interferón- $\alpha$  pegilado para evitar la aparición de cepas o *cuasi* especies víricas resistentes. Sin embargo, se continúa buscando nuevos compuestos o nuevas dianas del virus para conseguir, en un futuro, terapias combinadas de compuestos STAT-C libres de interferón. Así, por ejemplo, se ha observado que la proteína viral p7 (un canal iónico) es esencial para la liberación de los viriones. Se han diseñado inhibidores de p7 de baja masa molecular que ya se encuentran en fase inicial de evaluación; se ha comprobado que algunos de ellos son capaces de inhibir de forma efectiva la producción de virus en células en

cultivo [215]. Por último, cabe también mencionar los esfuerzos encaminados al desarrollo de vacunas que maximicen las respuestas inmunitaria humoral y celular con el fin de erradicar el virus [216].

## BIBLIOGRAFÍA

1. Ohland, C.L. & Macnaughton, W.K. (2010) Probiotic bacteria and intestinal epithelial barrier function. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **298**, G807-819.
2. Weichselbaum, E. (2010) Potential benefits of probiotics - main findings of an in-depth review. *Br. J. Community Nurs.* **15**, 110-114.
3. Fierer, N., Hamady, M., Lauber, C.L. & Knight, R. (2008) The influence of sex, handedness, and washing on the diversity of hand surface bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 17994-17999.
4. Costello, E.K., Lauber, C.L., Hamady, M., Fierer, N., Gordon, J.I. & Knight, R. (2009) Bacterial community variation in human body habitats across space and time. *Science* **326**, 1694-1697.
5. D'Costa, J., Mansfield, S.G. & Humeau, L.M. (2009) Lentiviral vectors in clinical trials: Current status. *Curr. Opin. Mol. Ther.* **11**, 554-564.
6. Rozalén, J., Ceña, V. & Jordán, J. (2003) Terapia génica. Vectores de expresión. *OFFARM* **22**, 102-108.
7. Watanabe, D. (2010) Medical application of herpes simplex virus. *J. Dermatol. Sci.* **57**, 75-82.
8. Grossman, M., Raper, S.E., Kozarsky, K., Stein, E.A., Engelhardt, J.F., Muller, D., Lupien, P.J. & Wilson, J.M. (1994) Successful ex vivo gene therapy directed to liver in a patient with familial hypercholesterolemia. *Nat. Genet.* **6**, 335-341.
9. Matsuzaki, S., Rashel, M., Uchiyama, J., Sakurai, S., Ujihara, T., Kuroda, M., Ikeuchi, M., Tani, T., Fujieda, M., Wakiguchi, H. & Imai, S. (2005) Bacteriophage therapy: a revitalized therapy against bacterial infectious diseases. *J Infect Chemother* **11**, 211-219.
10. Budynek, P., Dabrowska, K., Skaradzinski, G. & Gorski, A. (2010) Bacteriophages and cancer. *Arch. Microbiol.* **192**, 315-320.
11. Manchester, M. & Singh, P. (2006) Virus-based nanoparticles (VNPs): platform technologies for diagnostic imaging. *Adv Drug Deliv Rev* **58**, 1505-1522.
12. Arap, W., Pasqualini, R. & Ruoslahti, E. (1998) Cancer treatment by targeted drug delivery to tumor

- vasculature in a mouse model. *Science* **279**, 377-380.
13. Kuruppu, D. & Tanabe, K.K. (2005) Viral oncolysis by herpes simplex virus and other viruses. *Cancer Biol. Ther.* **4**, 524-531.
14. Stanford, M.M., Bell, J.C. & Vähä-Koskela, M.J. (2010) Novel oncolytic viruses: Riding high on the next wave? *Cytokine Growth Factor Rev.* **21**, 177-183.
15. Jenner, E. (2001) *The three original publications on vaccination against smallpox*. P.F. Collier & Son, Nueva York.
16. Sack, D.A., Sack, R.B., Nair, G.B. & Siddique, A.K. (2004) Cholera. *Lancet* **363**, 223-233.
17. Fernández, A. (1985) *Epidemias y sociedad en Madrid*. Vicens-Vives, Barcelona.
18. Lopez, A.L., Clemens, J.D., Deen, J. & Jodar, L. (2008) Cholera vaccines for the developing world. *Hum. Vaccin.* **4**, 165-169.
19. Potter, C.W. (2001) A history of influenza. *J. Appl. Microbiol.* **91**, 572-579.
20. Hampson, A.W. & Mackenzie, J.S. (2006) The influenza viruses. *Med. J. Aust.* **185**, S39-43.
21. Nicholls, H. (2006) Pandemic influenza: the inside story. *PLoS Biol.* **4**, e50.
22. Ansart, S., Pelat, C., Boelle, P.Y., Carrat, F., Flahault, A. & Valleron, A.J. (2009) Mortality burden of the 1918-1919 influenza pandemic in Europe. *Influenza Other Respi. Viruses* **3**, 99-106.
23. Johnson, N.P. & Mueller, J. (2002) Updating the accounts: global mortality of the 1918-1920 "Spanish" influenza pandemic. *Bull. Hist. Med.* **76**, 105-115.
24. Smith, W., Andrews, C.H. & Laidlaw, P.P. (1933) A virus obtained from influenza patients. *Lancet* **2**, 66-68.
25. Francis, T., Jr. (1934) Transmission of influenza by a filterable virus. *Science* **80**, 457-459.
26. Narain, J.P., Kumar, R. & Bhatia, R. (2009) Pandemic (H1N1) 2009: epidemiological, clinical and prevention aspects. *Natl. Med. J. India* **22**, 242-247.
27. Tumpey, T.M., Basler, C.F., Aguilar, P.V., Zeng, H., Solorzano, A., Swayne, D.E., Cox, N.J., Katz, J.M., Taubenberger, J.K., Palese, P. & Garcia-Sastre, A. (2005) Characterization of the reconstructed 1918 Spanish influenza pandemic virus. *Science* **310**, 77-80.
28. Tumpey, T.M. & Belser, J.A. (2009) Resurrected pandemic influenza viruses. *Annu. Rev. Microbiol.* **63**, 79-98.
29. Tumpey, T.M., Maines, T.R., Van Hoeven, N., Glaser, L., Solorzano, A., Pappas, C., Cox, N.J., Swayne, D.E., Palese, P., Katz, J.M. & Garcia-Sastre, A. (2007) A two-amino acid change in the hemagglutinin of the 1918 influenza virus abolishes transmission. *Science* **315**, 655-659.
30. Billharz, R., Zeng, H., Proll, S.C., Korth, M.J., Lederer, S., Albrecht, R., Goodman, A.G., Rosenzweig, E., Tumpey, T.M., Garcia-Sastre, A. & Katze, M.G. (2009) The NS1 protein of the 1918 pandemic influenza virus blocks host interferon and lipid metabolism pathways. *J. Virol.* **83**, 10557-10570.
31. Daley, C.L. (2010) Update in tuberculosis 2009. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **181**, 550-555.
32. Del Giudice, G., Pizza, M. & Rappuoli, R. (1998) Molecular basis of vaccination. *Mol. Aspects Med.* **19**, 1-70.
33. Butler, J.C. (1997) Epidemiology of pneumococcal serotypes and conjugate vaccine formulations. *Microb Drug Resist* **3**, 125-129.
34. Butler, J.C., Shapiro, E.D. & Carbone, G.M. (1999) Pneumococcal vaccines: history, current status, and future directions. *Am. J. Med.* **107**, 69S-76S.
35. Okada, M. & Kita, Y. (2010) Tuberculosis vaccine development: The development of novel (preclinical) DNA vaccine. *Hum. Vaccin.* **6**, 297-308.
36. Vilaplana, C., Montané, E., Pinto, S., Barriocanal, A.M., Domenech, G., Torres, F., Cardona, P.J. & Costa, J. (2010) Double-blind, randomized, placebo-controlled Phase I Clinical Trial of the therapeutical antituberculous vaccine RUTI. *Vaccine* **28**, 1106-1116.
37. Jacobs, B.L., Langland, J.O., Kibler, K.V., Denzler, K.L., White, S.D., Holechek, S.A., Wong, S., Huynh, T. & Baskin, C.R. (2009) *Vaccinia* virus vaccines: past, present and future. *Antiviral Res.* **84**, 1-13.
38. Salk, J.E. (1955) Present status of the problem of vaccination against poliomyelitis. *Am. J. Public Health Nations Health* **45**, 285-297.
39. Sabin, A.B. (1957) Present status of attenuated live virus poliomyelitis vaccine. *Bull. N. Y. Acad. Med.* **33**, 17-39.
40. Gromeier, M., Bossert, B., Arita, M., Nomoto, A. & Wimmer, E. (1999) Dual stem loops within the polio-virus internal ribosomal entry site control neurovirulence. *J. Virol.* **73**, 958-964.
41. Artenstein, A.W. (2008) New generation smallpox vaccines: a review of preclinical and clinical data. *Rev. Med. Virol.* **18**, 217-231.
42. Perera, L.P., Waldmann, T.A., Mosca, J.D., Baldwin, N., Berzofsky, J.A. & Oh, S.K. (2007) Development of smallpox vaccine candidates with integrated interleukin-15 that demonstrate superior immunogenicity, efficacy, and safety in mice. *J. Virol.* **81**, 8774-8783.
43. Perera, P.Y., Derrick, S.C., Kolibab, K., Momoi, F., Yamamoto, M., Morris, S.L., Waldmann, T.A. & Perera, L.P. (2009) A multi-valent *vaccinia* virus-based tuberculosis vaccine molecularly adjuvanted

- with interleukin-15 induces robust immune responses in mice. *Vaccine* **27**, 2121-2127.
44. Ito, T., Wang, D.Q., Maru, M., Nakajima, K., Kato, S., Kurimura, T. & Wakamiya, N. (1990) Antitumor efficacy of *vaccinia* virus-modified tumor cell vaccine. *Cancer Res.* **50**, 6915-6918.
45. Thorne, S.H., Hwang, T.H. & Kirn, D.H. (2005) *Vaccinia* virus and oncolytic virotherapy of cancer. *Curr. Opin. Mol. Ther.* **7**, 359-365.
46. Goetz, C. & Gromeier, M. (2010) Preparing an oncolytic poliovirus recombinant for clinical application against glioblastoma multiforme. *Cytokine Growth Factor Rev.* **21**, 197-203.
47. Boonyarattanakalin, S., Liu, X., Michieletti, M., Lepenies, B. & Seeberger, P.H. (2008) Chemical synthesis of all phosphatidylinositol mannoside (PIM) glycans from *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 16791-16799.
48. Hecht, M.L., Stallforth, P., Silva, D.V., Adibekian, A. & Seeberger, P.H. (2009) Recent advances in carbohydrate-based vaccines. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **13**, 354-359.
49. Angert, E.R., Clements, K.D. & Pace, N.R. (1993) The largest bacterium. *Nature* **362**, 239-241.
50. Clements, K.D. & Bullivant, S. (1991) An unusual symbiont from the gut of surgeonfishes may be the largest known prokaryote. *J. Bacteriol.* **173**, 5359-5362.
51. Schulz, H.N., Brinkhoff, T., Ferdelman, T.G., Marine, M.H., Teske, A. & Jorgensen, B.B. (1999) Dense populations of a giant sulfur bacterium in Namibian shelf sediments. *Science* **284**, 493-495.
52. Kong, K.F., Schneper, L. & Mathee, K. (2010) Beta-lactam antibiotics: from antibiosis to resistance and bacteriology. *APMIS* **118**, 1-36.
53. Sauvage, E., Kerff, F., Terrak, M., Ayala, J.A. & Charlier, P. (2008) The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiol. Rev.* **32**, 234-258.
54. Zapun, A., Contreras-Martel, C. & Vernet, T. (2008) Penicillin-binding proteins and  $\beta$ -lactam resistance. *FEMS Microbiol. Rev.* **32**, 361-385.
55. Escherich, T. (1885) Die Darmbakterien des Neugeborenen und Säuglings. *Fortschr. Med.* **3**, 515-522.
56. Meberg, B.M., Sailer, F.C., Nelson, D.E. & Young, K.D. (2001) Reconstruction of *Escherichia coli* mrcA (PBP 1a) mutants lacking multiple combinations of penicillin binding proteins. *J. Bacteriol.* **183**, 6148-6149.
57. Tipper, D.J. & Strominger, J.L. (1965) Mechanism of action of penicillins: a proposal based on their structural similarity to acyl-D-alanyl-D-alanine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **54**, 1133-1141.
58. Pacini, F. (1854) Osservazioni microscopiche e deduzioni patologiche sul cholera asiatico. Tipografia Bencini, Florencia.
59. Pasteur, L. (1880) Sur les maladies virulentes, et en particulier sur la maladie appelee vulgairement cholera des poules. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Academie des Sciences* **90**, 239-248.
60. Pasteur, L., Chamberland, C. & Roux, P.P.E. (1881) De l'atténuation des virus et de leur retoe à la virulence. *Comptes Rendus des Séances de L'Academie des Sciences* **92**, 430-435.
61. Pasteur, L. (1885) Méthode pour prévenir la rage après morsure. *Comptes Rendus des Séances de L'Academie des Sciences* **101**, 765-772.
62. Koch, R. (1877) Verfahrungen zur Untersuchung, zum Conserviren und Photographiren der Bacterien. *Beiträge zur Biologie der Pflanzen* **2**, 399-434.
63. Koch, R. (1884) Die Aetiologie der Tuberkulose. *Mittheilungen aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamte* **2**, 1-88.
64. Koch, R. (1884) Ueber die Cholerabakterien. *Dtsch. Med. Wochenschr.* **10**, 725-728.
65. Mechnikoff, I. (1884) Über eine Sprosspilzkrankheit der Daphnien. Beitrag zur Lehre über den Kampf der Phagocyten gegen Krankheitserreger. *Archiv f. pathologische Anatomie und Physiologie und f. klinische Medizin* **96**, 177-195.
66. Loeffler, F. (1884) Untersuchung über die Bedeutung der Mikroorganismen für die Entstehung der Diphterie beim Menschen, bei der Taube und beim Kalbe. *Mittheilungen aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamte* **2**, 421-499.
67. Konturek, J.W. (2003) Discovery by Jaworski of *Helicobacter pylori* and its pathogenetic role in peptic ulcer, gastritis and gastric cancer. *J. Physiol. Pharmacol.* **54 Suppl 3**, 23-41.
68. Bosch, F. & Rosich, L. (2008) The contributions of Paul Ehrlich to pharmacology: a tribute on the occasion of the centenary of his Nobel Prize. *Pharmacology* **82**, 171-179.
69. Buchanan, R.E. (1918) Life phases in a bacterial culture. *J. Infect. Dis.* **23**, 109-125.
70. Fleming, A. (1922) On a remarkable bacteriolytic element found in tissues and secretions. *Proc. Roy. Soc. London Ser. B* **93**.
71. Fleming, A. (1929) On the antibacterial action of cultures of a *Penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. *Br. J. Exp. Pathol.* **10**, 226-236.
72. Jones, D., Metzger, H.J., Schatz, A. & Waksman, S.A. (1944) Control of gram-negative bacteria in

- experimental animals by streptomycin. *Science* **100**, 103-105.
73. Pardee, A.B., Jacob, F. & Monod, J. (1959) Genetic control and cytoplasmic expression of inducibility in the synthesis of  $\beta$ -galactosidase by *E. coli*. *J. Mol. Biol.* **1**, 165-178.
74. Jacob, F., Perrin, D., Sanchez, C. & Monod, J. (1960) L'opéron : groupe de gènes à expression coordonnée par un opérateur. *C. R. Hebd. Séances Acad. Sci.* **250**, 1727-1729.
75. Brock, T.D. & Freeze, H. (1969) Thermus aquaticus gen. n. and sp. n., a nonsporulating extreme thermophile. *J. Bacteriol.* **98**, 289-297.
76. Ames, B.N., Lee, F.D. & Durston, W.E. (1973) An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **70**, 782-786.
77. Marshall, B.J. & Warren, J.R. (1984) Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* **1**, 1311-1315.
78. 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.
79. Ferdows, M.S. & Barbour, A.G. (1989) Megabase-sized linear DNA in the bacterium *Borrelia burgdorferi*, the Lyme disease agent. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **86**, 5969-5973.
80. Fleischmann, R.D., Adams, M.D., White, O., Clayton, R.A., Kirkness, E.F., Kerlavage, A.R., Bult, C.J., Tomb, J.F., Dougherty, B.A., Merrick, J.M., McKenney, K., Sutton, G., FitzHugh, W., Fields, C., Gocayne, J.D., Scott, J., Shirley, R., Liu, L., Glodek, A., Kelley, J.M., Weidman, J.F., Phillipps, C.A., Spriggs, T., Hedblom, E., Cotton, M.D., Utterback, T.R., Hanna, M.C., Nguyen, D.T., Saudek, D.M., Brandon, R.C., Fine, L.D., Fritchman, J.L., Fuhrmann, J.L., Geoghagen, N.S.M., Gnehm, C.L., McDonald, L.A., Small, K.V., Fraser, C.M., Smith, H.O. & Venter, J.C. (1995) Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science* **269**, 496-512.
81. Goffeau, A. (1997) The yeast genome directory. *Nature* **387**, 1-105.
82. Blattner, F.R., Plunkett, G., 3rd, Bloch, C.A., Perna, N.T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J.D., Rode, C.K., Mayhew, G.F., Gregor, J., Davis, N.W., Kirkpatrick, H.A., Goeden, M.A., Rose, D.J., Mau, B. & Shao, Y. (1997) The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* **277**, 1453-1462.
83. Heidelberg, J.F., Eisen, J.A., Nelson, W.C., Clayton, R.A., Gwinn, M.L., Dodson, R.J., Haft, D.H., Hickey, E.K., Peterson, J.D., Umayam, L., Gill, S.R., Nelson, K.E., Read, T.D., Tettelin, H., Richardson, D., Ermolaeva, M.D., Vamathevan, J., Bass, S., Qin, H., Dragoi, I., Sellers, P., McDonald, L., Utterback, T., Fleishmann, R.D., Nierman, W.C., White, O., Salzberg, S.L., Smith, H.O., Colwell, R.R., Mekalanos, J.J., Venter, J.C. & Fraser, C.M. (2000) DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae*. *Nature* **406**, 477-483.
84. Bentley, S.D., Chater, K.F., Cerdeño-Tárraga, A.M., Challis, G.L., Thomson, N.R., James, K.D., Harris, D.E., Quail, M.A., Kieser, H., Harper, D., Bateman, A., Brown, S., Chandra, G., Chen, C.W., Collins, M., Cronin, A., Fraser, A., Goble, A., Hidalgo, J., Hornsby, T., Howarth, S., Huang, C.H., Kieser, T., Larke, L., Murphy, L., Oliver, K., O'Neil, S., Rabbinowitsch, E., Rajandream, M.A., Rutherford, K., Rutter, S., Seeger, K., Saunders, D., Sharp, S., Squares, R., Squares, S., Taylor, K., Warren, T., Wietzorek, A., Woodward, J., Barrell, B.G., Parkhill, J. & Hopwood, D.A. (2002) Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature* **417**, 141-147.
85. Ikeda, H., Ishikawa, J., Hanamoto, A., Shinose, M., Kikuchi, H., Shiba, T., Sakaki, Y., Hattori, M. & Omura, S. (2003) Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*. *Nat Biotechnol* **21**, 526-531.
86. Chien, M., Morozova, I., Shi, S., Sheng, H., Chen, J., Gomez, S.M., Asamani, G., Hill, K., Nuara, J., Feder, M., Rineer, J., Greenberg, J.J., Steshenko, V., Park, S.H., Zhao, B., Teplitskaya, E., Edwards, J.R., Pampou, S., Georghiou, A., Chou, I.C., Iannuccilli, W., Ulz, M.E., Kim, D.H., Geringer-Sameth, A., Goldsberry, C., Morozov, P., Fischer, S.G., Segal, G., Qu, X., Rzhetsky, A., Zhang, P., Cayanis, E., De Jong, P.J., Ju, J., Kalachikov, S., Shuman, H.A. & Russo, J.J. (2004) The genomic sequence of the accidental pathogen *Legionella pneumophila*. *Science* **305**, 1966-1968.
87. Oliynyk, M., Samborskyy, M., Lester, J.B., Mironenko, T., Scott, N., Dickens, S., Haydock, S.F. & Leadlay, P.F. (2007) Complete genome sequence of the erythromycin-producing bacterium *Saccharopolyspora erythraea* NRRL23338. *Nat. Biotechnol.* **25**, 447-453.
88. Ghosh, J., Larsson, P., Singh, B., Pettersson, B.M., Islam, N.M., Sarkar, S.N., Dasgupta, S. & Kirsebom, L.A. (2009) Sporulation in mycobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 10781-10786.
89. Ban, N., Nissen, P., Hansen, J., Moore, P.B. & Steitz, T.A. (2000) The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution. *Science* **289**, 905-920.

90. Schluenzen, F., Tocilj, A., Zarivach, R., Harms, J., Gluehmann, M., Janell, D., Bashan, A., Bartels, H., Agmon, I., Franceschi, F. & Yonath, A. (2000) Structure of functionally activated small ribosomal subunit at 3.3 Å resolution. *Cell* **102**, 615-623.
91. Wimberly, B.T., Brodersen, D.E., Clemons, W.M., Jr., Morgan-Warren, R.J., Carter, A.P., Vonrhein, C., Hartsch, T. & Ramakrishnan, V. (2000) Structure of the 30S ribosomal subunit. *Nature* **407**, 327-339.
92. García-Rodríguez, J.A., Gomis, M., González, J. & Prieto, J. (1997) *Historia de la antibioterapia*. Ediciones Doyma, Madrid.
93. Laschtschenko, P. (1909) Über die keimtötende und entwicklungs hemmende Wirkung von Hühnereiweiß. *Z. Hyg. Infekt. Krankheiten* **64**.
94. Duchesne, E. (1897) Contribution à l'étude de la concurrence vitale chez les micro-organismes: antagonisme entre les moisissures et les microbes. Faculté de Médecine et de Pharmacie de Lyon, Lyon.
95. Waksman, S.A. & Lechevalier, H.A. (1949) Neomycin, a new antibiotic active against streptomycin-resistant bacteria, including tuberculosis organisms. *Science* **109**, 305-307.
96. Duggar, B.M. (1948) Aureomycin; a product of the continuing search for new antibiotics. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **51**, 177-181.
97. Burton, H.S. & Abraham, E.P. (1951) Isolation of antibiotics from a species of Cephalosporium; cephalosporins P1, P2, P3, P4, and P5. *Biochem. J.* **50**, 168-174.
98. McGuire, J.M., Bunch, R.L., Anderson, R.C., Boaz, H.E., Flynn, E.H., Powell, H.M. & Smith, J.W. (1952) Ilotycin ein neues Antibioticum. *Schweiz Med. Wochenschr.* **82**, 1064-1065.
99. Yanagisawa, K. & Sato, N. (1957) Studies on kanamycin, a new antibiotic against tubercle bacilli. I. Effect on virulent tubercle bacilli in vitro and in mice. *J. Antibiot. (Tokyo)* **10**, 233-235.
100. Vocabulario Científico y Técnico, 3<sup>a</sup> ed. Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. Ed. Espasa (1996).
101. Watve, M.G., Tickoo, R., Jog, M.M. & Bhole, B.D. (2001) How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*? *Arch. Microbiol.* **176**, 386-390.
102. Stein, T. (2005) *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Mol. Microbiol.* **56**, 845-857.
103. Silvaggi, N.R., Josephine, H.R., Kuzin, A.P., Nagarajan, R., Pratt, R.F. & Kelly, J.A. (2005) Crystal structures of complexes between the R61 DD-peptidase and peptidoglycan-mimetic β-lactams: a non-covalent complex with a "perfect penicillin". *J. Mol. Biol.* **345**, 521-533.
104. Moreland, J.L., Gramada, A., Buzko, O.V., Zhang, Q. & Bourne, P.E. (2005) The Molecular Biology Toolkit (MBT): a modular platform for developing molecular visualization applications. *BMC Bioinformatics* **6**, 21.
105. Johnson, B.A., Anker, H. & Meleney, F.L. (1945) Bacitracin: a new antibiotic produced by a member of the *B. subtilis* group. *Science* **102**, 376-377.
106. Siewert, G. & Strominger, J.L. (1967) Bacitracin: an inhibitor of the dephosphorylation of lipid pyrophosphate, an intermediate in the biosynthesis of the peptidoglycan of bacterial cell walls. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **57**, 767-773.
107. Li, J., Nation, R.L., Turnidge, J.D., Milne, R.W., Coulthard, K., Rayner, C.R. & Paterson, D.L. (2006) Colistin: the re-emerging antibiotic for multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections. *Lancet Infect. Dis.* **6**, 589-601.
108. Campbell, E.A., Korzheva, N., Mustaev, A., Murakami, K., Nair, S., Goldfarb, A. & Darst, S.A. (2001) Structural mechanism for rifampicin inhibition of bacterial RNA polymerase. *Cell* **104**, 901-912.
109. Sutcliffe, J.A. (2005) Improving on nature: antibiotics that target the ribosome. *Curr. Opin. Microbiol.* **8**, 534-542.
110. Wilson, D.N. (2009) The A-Z of bacterial translation inhibitors. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **44**, 393-433.
111. Carter, A.P., Clemons, W.M., Brodersen, D.E., Morgan-Warren, R.J., Wimberly, B.T. & Ramakrishnan, V. (2000) Functional insights from the structure of the 30S ribosomal subunit and its interactions with antibiotics. *Nature* **407**, 340-348.
112. Wilson, D.N., Schluenzen, F., Harms, J.M., Starosta, A.L., Connell, S.R. & Fucini, P. (2008) The oxazolidinone antibiotics perturb the ribosomal peptidyl-transferase center and effect tRNA positioning. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 13339-13344.
113. Seo, H.S., Abedin, S., Kamp, D., Wilson, D.N., Nierhaus, K.H. & Cooperman, B.S. (2006) EF-G-dependent GTPase on the ribosome: conformational change and fusidic acid inhibition. *Biochemistry (Mosc.)* **45**, 2504-2514.
114. Hurdle, J.G., O'Neill, A.J. & Chopra, I. (2005) Prospects for aminoacyl-tRNA synthetase inhibitors as new antimicrobial agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 4821-4833.
115. Ochsner, U.A., Sun, X., Jarvis, T., Critchley, I. & Janjic, N. (2007) Aminoacyl-tRNA synthetases: essential and still promising targets for new anti-infective agents. *Expert Opin. Investig. Drugs* **16**, 573-593.
116. Pope, A.J., Moore, K.J., McVey, M., Mensah, L., Benson, N., Osbourne, N., Broom, N., Brown, M.J.

- & O'Hanlon, P. (1998) Characterization of isoleucyl-tRNA synthetase from *Staphylococcus aureus*. II. Mechanism of inhibition by reaction intermediate and pseudomonic acid analogues studied using transient and steady-state kinetics. *J. Biol. Chem.* **273**, 31691-31701.
117. Dubos, R.J. (1939) Studies on a bactericidal agent extracted from a soil *bacillus* : I. Preparation of the agent. Its activity *in vitro*. *J. Exp. Med.* **70**, 1-10.
118. Van Epps, H.L. (2006) Rene Dubos: unearthing antibiotics. *J. Exp. Med.* **203**, 259.
119. Barrett, F.F., McGehee, R.F., Jr. & Finland, M. (1968) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at Boston City Hospital. Bacteriologic and epidemiologic observations. *N. Engl. J. Med.* **279**, 441-448.
120. Kenward, M.A., Brown, M.R., Heslewood, S.R. & Dillon, C. (1978) Influence of R-plasmid RP1 of *Pseudomonas aeruginosa* on cell wall composition, drug resistance, and sensitivity to cold shock. *Antimicrob. Agents Chemother.* **13**, 446-453.
121. Lambert, P.A. (2005) Bacterial resistance to antibiotics: modified target sites. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **57**, 1471-1485.
122. Guinane, C.M., Cotter, P.D., Ross, R.P. & Hill, C. (2006) Contribution of penicillin-binding protein homologs to antibiotic resistance, cell morphology, and virulence of *Listeria monocytogenes* EGDe. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**, 2824-2828.
123. Dore, M.P., Graham, D.Y. & Sepulveda, A.R. (1999) Different penicillin-binding protein profiles in amoxicillin-resistant *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* **4**, 154-161.
124. Coffey, T.J., Dowson, C.G., Daniels, M. & Spratt, B.G. (1995) Genetics and molecular biology of beta-lactam-resistant pneumococci. *Microb. Drug Resist.* **1**, 29-34.
125. Rybkine, T., Mainardi, J.L., Sougakoff, W., Collatz, E. & Gutmann, L. (1998) Penicillin-binding protein 5 sequence alterations in clinical isolates of *Enterococcus faecium* with different levels of beta-lactam resistance. *J. Infect. Dis.* **178**, 159-163.
126. Cui, L., Ma, X., Sato, K., Okuma, K., Tenover, F.C., Mamizuka, E.M., Gemmell, C.G., Kim, M.N., Ploy, M.C., El-Solh, N., Ferraz, V. & Hiramatsu, K. (2003) Cell wall thickening is a common feature of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* **41**, 5-14.
127. Bugg, T.D., Wright, G.D., Dutka-Malen, S., Arthur, M., Courvalin, P. & Walsh, C.T. (1991) Molecular basis for vancomycin resistance in *Enterococcus faecium* BM4147: biosynthesis of a depsipeptide peptidoglycan precursor by vancomycin resistance proteins VanH and VanA. *Biochemistry (Mosc.)* **30**, 10408-10415.
128. Abraham, E.P. & Chain, E. (1940) An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Nature* **146**, 837-837.
129. Kirby, W.M.M. (1945) Bacteriostatic and lytic actions of penicillin on sensitive and resistant *Staphylococci*. *J. Clin. Invest.* **24**, 165-169.
130. Bo, G. (2000) Giuseppe Brotzu and the discovery of cephalosporins. *Clin. Microbiol. Infect.* **6 Suppl 3**, 6-9.
131. Ng, E.Y., Trucks, M. & Hooper, D.C. (1996) Quinolone resistance mutations in topoisomerase IV: relationship to the *flqA* locus and genetic evidence that topoisomerase IV is the primary target and DNA gyrase is the secondary target of fluoroquinolones in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**, 1881-1888.
132. Willmott, C.J. & Maxwell, A. (1993) A single point mutation in the DNA gyrase A protein greatly reduces binding of fluoroquinolones to the gyrase-DNA complex. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**, 126-127.
133. Ramaswamy, S. & Musser, J.M. (1998) Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: 1998 update. *Tuber. Lung Dis.* **79**, 3-29.
134. Canu, A., Malbruny, B., Coquemont, M., Davies, T.A., Appelbaum, P.C. & Leclercq, R. (2002) Diversity of ribosomal mutations conferring resistance to macrolides, clindamycin, streptogramin, and telithromycin in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**, 125-131.
135. Rose, W.E. & Rybak, M.J. (2006) Tigecycline: first of a new class of antimicrobial agents. *Pharmacotherapy* **26**, 1099-1110.
136. Maguire, B.A. (2009) Inhibition of bacterial ribosome assembly: a suitable drug target? *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **73**, 22-35.
137. Breitbart, M. & Rohwer, F. (2005) Here a virus, there a virus, everywhere the same virus? *Trends Microbiol.* **13**, 278-284.
138. Baltimore, D. (1971) Expression of animal virus genomes. *Bacteriol. Rev.* **35**, 235-241.
139. Hernandez, L.D., Hoffman, L.R., Wolfsberg, T.G. & White, J.M. (1996) Virus-cell and cell-cell fusion. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **12**, 627-661.
140. Ivanovsky, D. (1892) Über die Mosaikkrankheit der Tabakspflanze. *Bull Acad Imp Sci St Petersbourg, Nouv Sér. 3* **35**, 67-70.
141. Chung, K.T. & Ferris, D.H. (1996) Martinus Willem Beijerinck (1851-1931) - Pioneer of general microbiology. *Asm News* **62**, 539-543.
142. Loeffler, F. & Frosch, P. (1898) Berichte der Kommission zur Erforschung der Maul- und Klauenseuche bei dem Institut für

- Infektionskrankheit in Berlin. *Centralbl f Bakteriol I* **23**, 371-391.
143. Loeffler, F. (1898) IV. Berich der Kommission zur Erforschung der Maul- und Klauenseuche bei dem Institut für Infektionskrankheit in Berlin. *Centralbl f Bakteriol I* **24**, 569-574.
144. Harrison, R.G. (1907) Observations on the living developing nerve fiber. *Anat. Rec.* **1**, 116-118.
145. Rous, P. (1911) Transmission of a malignant new growth by means of a cell-free filtrate. *JAMA* **56**, 198.
146. Steinhardt, L., Israeli, C. & Lambert, R.A. (1913) Studies on the cultivation of the virus of *vaccinia*. *J. Infect. Dis.* **13**, 294-300.
147. d'Herelle, F. (1917) Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentériques. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de L'Academie des Sciences* **165**, 373-375.
148. Maitland, H.B. & Maitland, M.C. (1928) Cultivation of *vaccinia* virus without tissue culture. *Lancet* **2**, 596-597.
149. Goodpasture, E.W., Woodruff, A.M. & Buddingh, G.J. (1931) The cultivation of vaccine and other viruses in the chorioallantoic membrane of chick embryos. *Science* **74**, 371-372.
150. Ruska, H., von Borries, B. & Ruska, E. (1940) Die Bedeutung der Übermikroskopie für die Virusforschung. *Arch ges Virusforsch* **1**, 155-169.
151. Stanley, W.M. (1935) Isolation of a crystalline protein possessing the properties of tobacco-mosaic virus. *Science* **81**, 644-645.
152. Bawden, F.C. & Pirie, N.W. (1937) The isolation and some properties of liquid crystalline substances from solanaceous plants infected with three strains of tobacco mosaic virus. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **123**, 274-320.
153. Bernal, J.D. & Fankuchen, I. (1941) X-Ray and Crystallographic Studies of Plant Virus Preparations. Iii. *J. Gen. Physiol.* **25**, 147-165.
154. Bernal, J.D. & Fankuchen, I. (1941) X-Ray and Crystallographic Studies of Plant Virus Preparations: I. Introduction and Preparation of Specimens II. Modes of Aggregation of the Virus Particles. *J. Gen. Physiol.* **25**, 111-146.
155. Enders, J.F., Weller, T.H. & Robbins, F.C. (1949) Cultivation of the Lansing strain of poliomyelitis virus in cultures of various human embryonic tissues. *Science* **109**, 85-87.
156. Hershey, A.D. & Chase, M. (1952) Independent functions of viral protein and nucleic acid in growth of bacteriophage. *J. Gen. Physiol.* **36**, 39-56.
157. Franklin, R.E. (1955) Structure of tobacco mosaic virus. *Nature* **175**, 379-381.
158. Raju, T.N. (1999) The Nobel chronicles. 1969: Max Delbrück (1906-81); Salvador Luria (1912-91); and Alfred Hershey (1908-97). *Lancet* **354**, 784.
159. Baltimore, D. (1970) RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. *Nature* **226**, 1209-1211.
160. Temin, H.M. (1965) The mechanism of carcinogenesis by avian sarcoma viruses. 1. Cell multiplication and differentiation. *J. Natl. Cancer Inst.* **35**, 679-693.
161. Temin, H.M. & Mizutani, S. (1970) RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature* **226**, 1211-1213.
162. Stehelin, D., Varmus, H.E., Bishop, J.M. & Vogt, P.K. (1976) DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA. *Nature* **260**, 170-173.
163. McAleer, W.J., Buynak, E.B., Maigetter, R.Z., Wampler, D.E., Miller, W.J. & Hilleman, M.R. (1984) Human hepatitis B vaccine from recombinant yeast. *Nature* **307**, 178-180.
164. Valenzuela, P., Medina, A., Rutter, W.J., Ammerer, G. & Hall, B.D. (1982) Synthesis and assembly of hepatitis B virus surface antigen particles in yeast. *Nature* **298**, 347-350.
165. Barré-Sinoussi, F., Chermann, J.C., Rey, F., Nugeyre, M.T., Chamaret, S., Gruest, J., Dauguet, C., Axler-Blin, C., Vezinet-Brun, F., Rouzioux, C., Rozenbaum, W. & Montagnier, L. (1983) Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **220**, 868-871.
166. Montagnier, L. (2010) 25 years after HIV discovery: prospects for cure and vaccine. *Virology* **397**, 248-254.
167. Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E. & Mello, C.C. (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**, 806-811.
168. Beigel, J.H., Farrar, J., Han, A.M., Hayden, F.G., Hyer, R., de Jong, M.D., Lochindarat, S., Nguyen, T.K., Nguyen, T.H., Tran, T.H., Nicoll, A., Touch, S. & Yuen, K.Y. (2005) Avian influenza A (H5N1) infection in humans. *N. Engl. J. Med.* **353**, 1374-1385.
169. Li, K.S., Guan, Y., Wang, J., Smith, G.J., Xu, K.M., Duan, L., Rahardjo, A.P., Puthavathana, P., Buranathai, C., Nguyen, T.D., Estoepangestie, A.T., Chaiseng, A., Auewarakul, P., Long, H.T., Hanh, N.T., Webby, R.J., Poon, L.L., Chen, H., Shortridge, K.F., Yuen, K.Y., Webster, R.G. & Peiris, J.S. (2004) Genesis of a highly pathogenic and potentially pandemic H5N1 influenza virus in eastern Asia. *Nature* **430**, 209-213.
170. Itoh, Y., Shinya, K., Kiso, M., Watanabe, T., Sakoda, Y., Hatta, M., Muramoto, Y., Tamura, D., Sakai-

- Tagawa, Y., Noda, T., Sakabe, S., Imai, M., Hatta, Y., Watanabe, S., Li, C., Yamada, S., Fujii, K., Murakami, S., Imai, H., Kakugawa, S., Ito, M., Takano, R., Iwatsuki-Horimoto, K., Shimojima, M., Horimoto, T., Goto, H., Takahashi, K., Makino, A., Ishigaki, H., Nakayama, M., Okamatsu, M., Warshauer, D., Shult, P.A., Saito, R., Suzuki, H., Furuta, Y., Yamashita, M., Mitamura, K., Nakano, K., Nakamura, M., Brockman-Schneider, R., Mitamura, H., Yamazaki, M., Sugaya, N., Suresh, M., Ozawa, M., Neumann, G., Gern, J., Kida, H., Ogasawara, K. & Kawaoka, Y. (2009) In vitro and in vivo characterization of new swine-origin H1N1 influenza viruses. *Nature* **460**, 1021-1025.
171. Norrby, E. (2008) Nobel Prizes and the emerging virus concept. *Arch. Virol.* **153**, 1109-1123.
172. Esté, J.A. & Cihlar, T. (2010) Current status and challenges of antiretroviral research and therapy. *Antiviral Res.* **85**, 25-33.
173. De Clercq, E. (2010) Highlights in the discovery of antiviral drugs: a personal retrospective. *J. Med. Chem.* **53**, 1438-1450.
174. De Clercq, E. (2010) In search of a selective therapy of viral infections. *Antiviral Res.* **85**, 19-24.
175. Foster, J.R. (2002) One hundred years of virology: a chief's perspective. *Commun. Dis. Public Health* **5**, 78-86.
176. Parker, F. & Nye, R.N. (1925) Studies on Filterable Viruses: II. Cultivation of Herpes Virus. *Am J Pathol* **1**, 337-340.
177. Parker, F. & Nye, R.N. (1925) Studies on Filterable Viruses: I. Cultivation of Vaccine Virus. *Am J Pathol* **1**, 325-335.
178. Norrby, E. & Prusiner, S.B. (2007) Polio and Nobel prizes: looking back 50 years. *Ann. Neurol.* **61**, 385-395.
179. zur Hausen, H. (2009) Papillomaviruses in the causation of human cancers - a brief historical account. *Virology* **384**, 260-265.
180. Andrei, G., Duraffour, S., Van den Oord, J. & Snoeck, R. (2010) Epithelial raft cultures for investigations of virus growth, pathogenesis and efficacy of antiviral agents. *Antiviral Res.* **85**, 431-449.
181. Elion, G.B. (1982) Mechanism of action and selectivity of acyclovir. *Am. J. Med.* **73**, 7-13.
182. Elion, G.B. (1993) Acyclovir: discovery, mechanism of action, and selectivity. *J. Med. Virol. Suppl* **1**, 2-6.
183. Marchand, B., Tchesnokov, E.P. & Gotte, M. (2007) The pyrophosphate analogue foscarnet traps the pre-translocational state of HIV-1 reverse transcriptase in a Brownian ratchet model of polymerase translocation. *J. Biol. Chem.* **282**, 3337-3346.
184. Johnson, M. (2009) Raltegravir use in special popu-  
lations. *Eur. J. Med. Res.* **14 Suppl 3**, 43-46.
185. Isaacs, A. & Lindenmann, J. (1957) Virus interference. I. The interferon. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **147**, 258-267.
186. Samuel, C.E. (2001) Antiviral actions of interferons. *Clin. Microbiol. Rev.* **14**, 778-809.
187. Content, J. (2009) Mechanisms of induction and action of interferons. *Verh. K. Acad. Geneesk. Belg.* **71**, 51-71.
188. García, M.A., Gil, J., Ventoso, I., Guerra, S., Domingo, E., Rivas, C. & Esteban, M. (2006) Impact of protein kinase PKR in cell biology: from antiviral to antiproliferative action. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **70**, 1032-1060.
189. Perdigero, B. & Esteban, M. (2009) The interferon system and *vaccinia* virus evasion mechanisms. *J. Interferon Cytokine Res.* **29**, 581-598.
190. Thiel, D.J., le Du, M.H., Walter, R.L., D'Arcy, A., Chene, C., Fountoulakis, M., Garotta, G., Winkler, F.K. & Ealick, S.E. (2000) Observation of an unexpected third receptor molecule in the crystal structure of human interferon- $\gamma$  receptor complex. *Structure* **8**, 927-936.
191. Quadt-Akabayov, S.R., Chill, J.H., Levy, R., Kessler, N. & Anglister, J. (2006) Determination of the human type I interferon receptor binding site on human interferon-alpha2 by cross saturation and an NMR-based model of the complex. *Protein Sci.* **15**, 2656-2668.
192. Kelly, E.J., Hadac, E.M., Cullen, B.R. & Russell, S.J. (2010) MicroRNA antagonism of the picornaviral life cycle: alternative mechanisms of interference. *PLoS Pathog.* **6**, e1000820
193. Kurzynska-Kokorniak, A., Jackowiak, P. & Figlerowicz, M. (2009) Human- and virus-encoded microRNAs as potential targets of antiviral therapy. *Mini Rev. Med. Chem.* **9**, 927-937.
194. Ouellet, D.L. & Provost, P. (2010) Current knowledge of microRNAs and noncoding RNAs in virus-infected cells. *Methods Mol. Biol.* **623**, 35-65.
195. Pawlotsky, J.M. (2006) Therapy of hepatitis C: from empiricism to eradication. *Hepatology* **43**, S207-220.
196. Choo, Q.L., Richman, K.H., Han, J.H., Berger, K., Lee, C., Dong, C., Gallegos, C., Coit, D., Medina-Selby, R., Barr, P.J. & et al. (1991) Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**, 2451-2455.
197. Scarselli, E., Ansuini, H., Cerino, R., Roccasecca, R.M., Acali, S., Filocamo, G., Traboni, C., Nicosia, A., Cortese, R. & Vitelli, A. (2002) The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *EMBO J.* **21**, 5017-5025.

- 198.** Molina, S., Castet, V., Fournier-Wirth, C., Pichard-Garcia, L., Avner, R., Harats, D., Roitelman, J., Barbaras, R., Gruber, P., Ghersa, P., Smolarsky, M., Funaro, A., Malavasi, F., Larrey, D., Coste, J., Fabre, J.M., Sa-Cunha, A. & Maurel, P. (2007) The low-density lipoprotein receptor plays a role in the infection of primary human hepatocytes by hepatitis C virus. *J. Hepatol.* **46**, 411-419.
- 199.** Diedrich, G. (2006) How does hepatitis C virus enter cells? *FEBS J.* **273**, 3871-3885.
- 200.** Hügle, T., Fehrman, F., Bieck, E., Kohara, M., Kräusslich, H.G., Rice, C.M., Blum, H.E. & Moradpour, D. (2001) The hepatitis C virus non-structural protein 4B is an integral endoplasmic reticulum membrane protein. *Virology* **284**, 70-81.
- 201.** Kim, C.S., Seol, S.K., Song, O.K., Park, J.H. & Jang, S.K. (2007) An RNA-binding protein, hnRNP A1, and a scaffold protein, septin 6, facilitate hepatitis C virus replication. *J. Virol.* **81**, 3852-3865.
- 202.** Waller, H., Chatterji, U., Gallay, P., Parkinson, T. & Targett-Adams, P. (2010) The use of AlphalISA technology to detect interaction between hepatitis C virus-encoded NS5A and cyclophilin A. *J. Virol. Methods* **165**, 202-210.
- 203.** Hope, R.G. & McLauchlan, J. (2000) Sequence motifs required for lipid droplet association and protein stability are unique to the hepatitis C virus core protein. *J. Gen. Virol.* **81**, 1913-1925.
- 204.** Scheller, N., Mina, L.B., Galão, R.P., Chari, A., Giménez-Barcons, M., Noueiry, A., Fischer, U., Meyerhans, A. & Díez, J. (2009) Translation and replication of hepatitis C virus genomic RNA depends on ancient cellular proteins that control mRNA fates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 13517-13522.
- 205.** André, P. & Lotteau, V. (2008) Hepatitis C virus assembly: when fat makes it easier. *J. Hepatol.* **49**, 153-155.
- 206.** McLauchlan, J. (2009) Hepatitis C virus: viral proteins on the move. *Biochem. Soc. Trans.* **37**, 986-990.
- 207.** Jose, J., Snyder, J.E. & Kuhn, R.J. (2009) A structural and functional perspective of alphavirus replication and assembly. *Future Microbiol.* **4**, 837-856.
- 208.** Nayak, D.P., Hui, E.K. & Barman, S. (2004) Assembly and budding of influenza virus. *Virus Res.* **106**, 147-165.
- 209.** Cheung, W., Gill, M., Esposito, A., Kaminski, C., Courousse, N., Chwetzoff, S., Trugnan, G., Keshavan, N., Lever, A. & Desselberger, U. (2010) Rotaviruses associate with cellular lipid droplet components to replicate in viroplasms, and compounds disrupting or blocking lipid droplets inhibit viroplasm formation and viral replication. *J. Virol.* **84**, 6782-6798.
- 210.** Qinfen, Z., Jinming, C., Xiaojun, H., Huanying, Z., Jicheng, H., Ling, F., Kunpeng, L. & Jingqiang, Z. (2004) The life cycle of SARS coronavirus in Vero E6 cells. *J. Med. Virol.* **73**, 332-337.
- 211.** Fontana, J., López-Montero, N., Elliott, R.M., Fernández, J.J. & Risco, C. (2008) The unique architecture of Bunyamwera virus factories around the Golgi complex. *Cell. Microbiol.* **10**, 2012-2028.
- 212.** Hadziyannis, S.J. & Papatheodoridis, G.V. (2004) Emerging treatments in chronic hepatitis B. *Expert Opin. Emerg. Drugs* **9**, 207-221.
- 213.** Feld, J.J. & Hoofnagle, J.H. (2005) Mechanism of action of interferon and ribavirin in treatment of hepatitis C. *Nature* **436**, 967-972.
- 214.** Lange, C.M., Sarrazin, C. & Zeuzem, S. (2010) Review article: HCV - STAT-C era of therapy. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **32**, 14-28.
- 215.** Griffin, S. (2010) Inhibition of HCV p7 as a therapeutic target. *Curr. Opin. Investig. Drugs* **11**, 175-181.
- 216.** Houghton, M. & Abrignani, S. (2005) Prospects for a vaccine against the hepatitis C virus. *Nature* **436**, 961-966.