

DE LA HEPATITIS NO-A, NO-B HACIA LA ELIMINACIÓN DEL VIRUS DE LA HEPATITIS C

FROM THE DISCOVERY OF NON-A, NON-B HEPATITIS VIRUS TOWARDS HEPATITIS C VIRUS ELIMINATION

Pablo Gastaminza Landart

Centro Nacional de Biotecnología. Agencia Estatal Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

RESUMEN

El 5 de octubre de 2020, la Asamblea Nobel y el Comité Nobel de Fisiología o Medicina, anunciaron que tres científicos, los Dres. Harvey Alter, Michael Houghton y Charles Rice serían los galardonados con el premio Nobel de Medicina 2020 "por el descubrimiento del virus de la hepatitis C". El virus de la hepatitis C (HCV) es uno de varios virus capaces de causar inflamación crónica del hígado y patologías potencialmente mortales como la cirrosis y carcinoma hepatocelular. Las observaciones del Dr. Harvey Alter en el Centro Clínico de los NIH provocaron el postulado de un virus que era diferente de los virus de la hepatitis A y la hepatitis B conocidos en ese momento. Después de muchos años de frustración tratando de identificar el agente infeccioso responsable del virus asociado a la transfusión no A, no B, utilizando técnicas virológicas convencionales, el Dr. Michael Houghton logró, no solo identificar inequívocamente HCV, sino también generar reactivos esenciales para prevenir la propagación del virus a través de transfusión de lotes de sangre contaminados. Estas herramientas y las herramientas moleculares posteriores que se desarrollaron tras este descubrimiento sugieren que más de 70 millones de personas están actualmente infectadas con HCV en todo el mundo. Tras muchos años de intentos frustrados de aislar y propagar el virus en modelos de cultivo celular para estudiar la virología básica del HCV, el Dr. Charles Rice fue pionero en muchos estudios con el objetivo de caracterizar funciones básicas de las proteínas virales para las que desarrolló, entre otros, sistemas de genética inversa y ensayos funcionales en forma de replicones, una herramienta biológica que fue fundamental para desarrollar las terapias antivirales actuales. Sin embargo, sus experimentos pioneros de genética inversa en el modelo del chimpancé, mediante los cuales rescató viriones infecciosos a partir de material genético viral clonado, aseguraron su presencia entre los premiados. En esta breve revisión, analizamos el contexto en el que se realizaron estas contribuciones fundamentales y cómo se ha impulsado la investigación en el campo hasta el punto en que la OMS sugiere la erradicación del virus utilizando las terapias disponibles actualmente.

ABSTRACT

In October 5 2020, the Nobel Assembly and the Nobel Committee for Physiology or Medicine, announced that three scientists Drs. Harvey Alter, Michael Houghton and Charles Rice were awarded with the Nobel prize in Medicine 2020 "for the discovery of the hepatitis C virus". Hepatitis C virus (HCV) is one of several viruses capable of causing chronic liver inflammation and life-threatening pathologies like cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Dr. Harvey Alter observations at the NIH Clinical Center prompted the postulate of a virus that was different from the hepatitis A and hepatitis B viruses known at that time. After many years of frustration trying to identify the infectious agent responsible for the non-A, non-B, transfusion-associated virus using conventional virological techniques, Dr. Michael Houghton succeeded not only at unequivocally identifying HCV, but also at generating essential reagents to prevent the spread of the virus through contaminated blood banks. These tools and subsequent molecular tools developed after this discovery suggest that more than 70 million people are currently infected with HCV worldwide. These studies were followed again by many years of frustrated attempts at isolating and propagating the virus in cell culture models to study basic virology on HCV. Dr. Charles Rice pioneered many studies aiming at characterizing basic functions of the viral proteins for which he developed among others, reverse genetics systems and functional assays in the form of replicons, a biological tool that was instrumental to develop the current antiviral therapies. However, its pioneer reverse genetics experiments in the chimpanzee model, by which he rescued infectious virions from cloned viral genetic material, granted his presence among the awardees. In this brief review, we discuss the context in which these seminal contributions were made and how HCV research has been propelled to the point where WHO is suggesting virus eradication using the currently available therapies.

Palabras Clave:

hepatitis C
transfusión
hepatitis viral
genética inversa
replicones
antivirales de acción directa

Keywords:

hepatitis C
transfusion
viral hepatitis,
reverse genetics
replicons
direct-acting antivirals

1. INTRODUCCIÓN

El pasado 5 de octubre de 2020, la Comisión de los Premios Nobel del Instituto Karolinska anunció la concesión del Premio Nobel de Medicina y Fisiología a tres investigadores: el Dr. Harvey Alter, el Dr. Michael Houghton y el Dr. Charles Rice, por las investigaciones que llevaron al descubrimiento del virus de la hepatitis C, el agente etiológico causante de más de 70 millones de infecciones crónicas y de más del 25% de los casos de cirrosis y cáncer de hígado en el mundo. En este artículo se presenta el contexto en el que se llevaron a cabo dichas investigaciones y se explicita cómo sus contribuciones no se circunscriben al mero descubrimiento de este virus, sino también al desarrollo de métodos diagnósticos y terapéuticos que hacen de la eliminación de la pandemia por el virus de la hepatitis C un objetivo viable para las próximas décadas según los planes de la Organización Mundial de la Salud.

2. LAS HEPATITIS VÍRICAS CONSTITUYEN UN IMPORTANTE PROBLEMA BIOMÉDICO A NIVEL MUNDIAL

^oLas hepatitis víricas están causadas por un grupo diverso de virus con genomas y estrategias de replicación muy diferentes que convergen en su capacidad para generar daño e inflamación del hígado por su tropismo hepático. Las hepatitis víricas causan más de 1,25 millones de muertes al año, una cifra comparable a las muertes causadas por tuberculosis y superiores a las causadas por el VIH (WHO, 2017). Sin embargo, mientras que la mortalidad causada por la tuberculosis y el VIH sigue disminuyendo el número de muertes por hepatitis víricas sigue aumentando y se prevé que siga aumentando en los próximos años (1). Este aumento se debe

principalmente a la alta incidencia de patologías derivadas de infecciones crónicas en pacientes portadores del virus de la hepatitis B (*Hepadnaviridae*) y de la hepatitis C (*Flaviviridae*). Dichas complicaciones derivan de una inflamación crónica del hígado (hepatitis) y fibrosis que puede llevar a alteraciones irreversibles de la función hepática como la cirrosis. La cirrosis a su vez está asociada con el desarrollo de carcinoma hepatocelular, una enfermedad con limitadas opciones terapéuticas que, junto con la cirrosis causó la muerte de más 1 millón de personas sólo en 2016 (1). Las hepatitis víricas crónicas constituyen el agente etiológico de alrededor del 50% de los casos totales de cirrosis y cáncer de hígado, por delante del consumo crónico de alcohol (1). Las patologías asociadas con las infecciones por virus de la hepatitis B o C derivan principalmente de una respuesta inmunológica activa, capaz de eliminar hepatocitos infectados, pero incapaz de erradicar la infección crónica del individuo, si bien los determinantes por los que la respuesta inmunológica del hospedador es ineficaz en el caso de la hepatitis B o en el caso de la hepatitis C son diferentes (2), (3).

Además de las infecciones crónicas, existen infecciones víricas que cursan en forma de hepatitis aguda. El virus de la hepatitis B, que causa graves patologías cuando establece infecciones crónicas, es además la primera causa de muerte por hepatitis vírica aguda, siendo responsable del 75% de las muertes por esta causa. El resto de muertes son asignables en su mayoría a la infección aguda por el virus de la hepatitis E (*Hepeviridae*) que constituye el 19% de las infecciones de hepatitis aguda y el virus de la hepatitis A (*Picornaviridae*) que constituye el 4%. El virus de la hepatitis C sólo causa la muerte por infección aguda excepcionalmente y supone el 2% de los casos restantes (1).

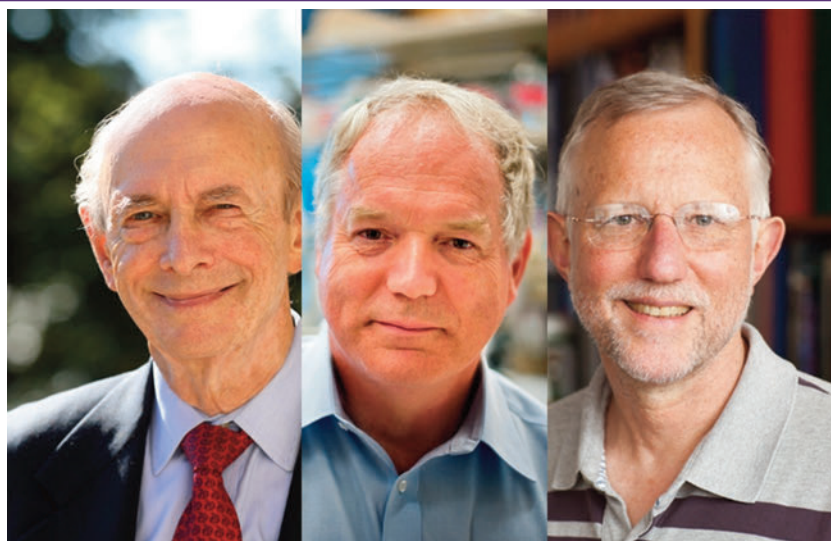


Figura 1: Fotografía de los tres investigadores premiados con el Nobel de Medicina y Fisiología 2020. De izqda. a dcha: Harvey Alter (NIH; EEUU); Michael Houghton (U. Alberta; CAN); Charles Rice (U. Rockefeller; EEUU). Fuente: Karolinska Institutet webpage.



3. BREVE PERSPECTIVA HISTÓRICA SOBRE LAS HEPATITIS INFECCIOSAS

Uno de los signos clínicos más evidentes de la hepatitis es la ictericia, que se manifiesta como consecuencia de la acumulación de bilirrubina en piel y mucosas y es especialmente evidente en la coloración amarillenta del blanco del ojo o esclerótica. El nombre ictericia se recoge en escritos de Plinio el viejo (29-71 A.C.), donde describe que la ictericia podría curarse observando un pájaro de color amarillo (Icteros). Si bien el nombre del signo clínico deriva de Icteros, existen referencias a la ictericia ya en escritos babilonios y chinos allá por el 3400 A.C. Por lo tanto, la ictericia y, probablemente las hepatitis víricas han acompañado al ser humano desde hace mucho tiempo. La primera referencia documentada del potencial infeccioso de la ictericia se infiere de las recomendaciones que el papa Zacarías hizo por carta a San Bonifacio en el año 751. Entre dichas recomendaciones se indicaba no suministrar la Comunión a personas con ictericia u otras dolencias y dejarlos para el final, una vez otras personas hubieran comulgado [revisado en (4)].

A lo largo de los años, el término ictericia epidémica o ictericia de campaña, dada la gran incidencia de este mal entre tropas enviadas a diversas campañas, fue sustituido por el término hepatitis infecciosa, gracias a los estudios realizados en el siglo XVIII, donde se observó que la ictericia coincidía con la "atrofia hepática". A lo largo de los siglos, el término hepatitis infecciosa se fue asentando para describir este mal asociado a brotes esporádicos atribuible en algunos casos a situaciones de insalubridad, sobre todo a fuentes de agua contaminada [revisado en (4)].

A medida que la ciencia médica fue avanzando y que fueron existiendo tratamientos o intervenciones médicas que implicaban la inyección de sustancias o fluidos en personas, comenzaron a aparecer referencias a otro tipo de hepatitis, no atribuibles a las causas anteriormente mencionadas, ni con una epidemiología en forma de brotes esporádicos. Así, el Dr. Lurmen (Brehme, 1885) acuñó el término "hepatitis del suero" tras observar una enorme incidencia de casos de hepatitis en una cohorte de personas inoculadas con linfa de un paciente infectado por Vaccinia, como método de vacunación frente a la viruela, señalando que se sospechaba de dicho paciente como fuente infecciosa de la hepatitis transmitida [revisado en (4)]. Unos años más tarde, el Dr. Stokes (USA, 1920) informaba de una incidencia mayor de lo normal de hepatitis del suero en la Clínica Mayo en una unidad donde se trataba a pacientes aquejados de sífilis con inyecciones de arsenamina (5). Por lo tanto, la idea de que además de una hepatitis infecciosa, existía un segundo tipo de hepatitis, la hepatitis del suero, se fue consolidando.

Durante la segunda guerra mundial, tanto los desplazamientos de tropas a diversas zonas del planeta endémicas para la hepatitis infecciosa, así como la creciente utilización de vacunas, tratamientos inyectables y transfusiones, los casos de hepatitis causaron serios estragos entre las tropas de ambos bandos, promoviendo una intensa investigación experimental en seres humanos en la década de los años cuarenta. Estas investigaciones realizadas en seres humanos, de dudosa calidad ética según los criterios actuales, no hicieron sino confirmar la existencia de agentes infecciosos que provocan hepatitis aguda y autolimitada, pero también agentes infecciosos que provocan un tipo de hepatitis con curso más prolongado y que parecía no ser eliminado con facilidad. [revisado en (4)].

Harvey Alter, un estudioso de la transmisión de la hepatitis por transfusión sanguínea

Una forma común de adquisición de la hepatitis del suero era la transfusión de sangre. En este sentido, el Dr. Harvey Alter, del Clinical Research Center del NIH, estaba implicado en la investigación del origen y agente etiológico responsable del elevado número de casos de hepatitis transmitidas por transfusión. En la década de los 60 ya se acuñaba el término hepatitis A para la hepatitis infecciosa y hepatitis B para la hepatitis del suero. Con el descubrimiento accidental de un antígeno presente en el suero de un individuo aborigen de Australia que reaccionaba con pacientes hemofílicos transfundidos en diversos lugares del mundo por parte del Dr. Alter y el Dr. Blumberg, el denominado antígeno Australiano (6), se sentaron las bases para la identificación de un agente infeccioso transmisible por la sangre, capaz de transmitir la hepatitis del suero. Este hallazgo, por parte del Dr. Blumberg y sus numerosos colaboradores, resultó en el descubrimiento del agente etiológico de la hepatitis B y de un test antigénico capaz de identificar dicho agente en los donantes de sangre (6). Este descubrimiento, por el que el Dr. Blumberg recibió el premio Nobel 1976, permitió estudiar a fondo la hepatitis del suero, transmitida por el virus de la hepatitis B. En este sentido, el Dr. Harvey Alter implementó diversas medidas preventivas para evitar la transmisión de la hepatitis en su centro de transfusiones. Además de emplear test sustitutivos, como la medida de las transaminasas en el plasma de los donantes, implementó los test antigénicos, basados en los hallazgos conjuntos con el Dr. Blumberg para cribar pacientes potencialmente infectados. Esta metodología permitió reducir la tasa de transmisión de hepatitis, pero no eliminarla completamente, siendo la tasa de transmisión aún demasiado elevada para el Dr. Alter (7).



Unos años después, en 1973, el equipo del Dr. Purcell del NIH, pudo identificar la existencia del virus de la hepatitis A, mediante la técnica de inmunomicroscopía electrónica (8), una técnica que también sería empleada para el diagnóstico de pacientes infectados y que el Dr. Alter empleó para el cribado de sus bancos de sangre. La disponibilidad de test serológicos para la detección de la hepatitis infecciosa (virus de la hepatitis A) y de la hepatitis del suero (virus de la hepatitis B) parecía poner fin a las preocupaciones del Dr. Alter, que por fin podría cribar los lotes de sangre para prevenir la transmisión de la hepatitis. No obstante, en 1975, el Dr. Alter publicó la transmisión de, todavía, numerosos casos de hepatitis de sangre de donantes negativos frente a antígenos de HAV o HBV (9). En este trabajo, por lo tanto, se infiere la existencia de un agente infeccioso no-A, no-B capaz de transmitir la hepatitis por transfusión, una noción que quedó demostrada en un estudio posterior mediante inoculación experimental de chimpancés con suero de pacientes con hepatitis no-A, no-B, que desarrollaron la enfermedad y establecieron el primer modelo experimental para este nuevo agente infeccioso. Las observaciones clínicas del Dr. Alter y otros, llevaron a identificar al virus no-A, no-B como un agente infeccioso responsable del desarrollo de hepatitis crónica y de su evolución hacia cirrosis (10).

Tras este éxito, siguieron años de frustración por la incapacidad de aislar el agente infeccioso mediante su propagación en cultivos celulares, algo que sin duda, retrasó la caracterización de lo que luego vendría a denominarse como el virus de la hepatitis C (11). En estos años, el único modelo de infección experimental continuó siendo el del chimpancé, lo que llevó a tener que emplear dichos animales para establecer parámetros tan básicos como el diámetro aproximado (60 nm) (12) o la presencia de una envuelta lipídica de la partícula infecciosa (13).

Michael Houghton: Técnicas moleculares para identificar el agente causante de la hepatitis no-A, no-B

La imposibilidad de aislar el virus causante de la hepatitis no-A, no-B llevó a los investigadores a tomar estrategias alternativas a las de la virología clásica para identificar inequívocamente el agente infeccioso. Una de estas estrategias fue la tomada por el equipo del Dr. Michael Houghton en la empresa Chiron (California, EEUU). El Dr. Houghton era experto en clonaje molecular y expresión de genes en sistemas recombinantes, como así atestigua su trabajo sobre el gen del interferón beta humano, que clonó y expresó de manera recombinante en bacterias (14). El Dr. Houghton estaba implicado en el clonaje y caracterización de los ácidos nucleicos del virus de la hepatitis no-A, no-B. Para ello tomaron diversos abor-

dajes experimentales, como la hibridación con sondas de virus de géneros a los que se sospechaba que pertenecía no-A, no-B como *Flaviviridae* o *Togaviridae*, sin éxito. Su experiencia en la expresión de proteínas recombinantes en bacteria y los trabajos de Shimizu y cols. en los que pudieron demostrar inmunoreactividad en especímenes histológicos de chimpancés infectados con no-A no-B (15), inspiraron la estrategia del equipo del Dr. Houghton para identificar el agente causante de la hepatitis. Esta metodología consistió en la generación de librería de ácidos nucleicos, tanto RNA como DNA, presentes en material ultracentrifugado a partir de plasma de chimpancés infectados con el virus no-A no-B. Estas colecciones de secuencias se clonaron en un fago recombinante ϕ gt11, vector capaz de inducir la expresión de los cDNA presentes en la colección en bacterias. La expresión de antígenos no-A, no-B sería posteriormente detectada mediante anticuerpos de pacientes convalecientes. Este proceso de cribado de miles de secuencias presentes en material infeccioso obtenido de chimpancés produjo numerosos resultados negativos, pero llevó a la identificación de un único clon molecular capaz de expresar antígenos susceptibles de ser reconocidos por los sueros (16). En este sentido, la utilización de un suero de un paciente con una hepatitis particularmente severa pareció ser la clave para la identificación del clon 5-1-1, que codifica el antígeno C100-3 (16).

La secuenciación de dicho clon, así como la de otros clones portadores de la secuencia, permitieron ensamblar un genoma viral de cadena sencilla y polaridad positiva de unas 9,600 nucleótidos de longitud, con un único marco de lectura abierta flanqueado por dos regiones aparentemente no traducidas (16). Este genoma relacionaba filogenéticamente a este agente con la familia *Flaviviridae*, que pasó a fundar un nuevo género de los Hepacivirus, bajo el nombre de virus de la hepatitis C (16).

El descubrimiento de una secuencia codificante de antígenos del agente responsable de la mayor parte de las hepatitis crónicas se presentó como una oportunidad para el Dr. Houghton para poder expresar dichos antígenos de forma recombinante con el objetivo de implementar el diagnóstico serológico de pacientes infectados por el virus de la hepatitis C (17). Esta metodología, publicada por el propio Houghton en colaboración con Dr. Alter, fue empleada para demostrar de manera retrospectiva y prospectiva que muchos pacientes de la hepatitis no-A, no-B eran portadores de anticuerpos que reconocían antígenos del recién descubierto virus de la hepatitis C (17,18). En años posteriores, la implementación de tests basados en antígenos inmunodominantes permitieron una notable reducción de los casos de hepatitis adquirida mediante transfusión (19,20), algo que se reflejó claramente en el número de casos de hepatitis aguda en EEUU. Estos logros en los que los Drs. Alter y Houghton estuvieron implicados, más allá de confirmar la existencia de un nuevo virus capaz de transmitir hepatitis crónica, permitieron un control parcial de su propagación mediante la implementación de tests serológicos de diagnóstico y cribado de los bancos de sangre (19,20).



Charles Rice: virología molecular para la generación de herramientas de estudio del virus

La identificación de este nuevo virus de gran relevancia biomédica atrajo sin duda la atención de numerosos investigadores que deseaban profundizar en las funciones de los diferentes elementos de RNA viral y de sus proteínas. Sin embargo, virólogos de todo el mundo se toparon con el hecho de que este virus no era susceptible de propagación en cultivos, dificultando así el estudio de sus funciones. No obstante, estudios basados en la sobreexpresión de proteínas virales permitieron comenzar a entender algunos de los aspectos fundamentales de la infección por HCV. Entre otros, el Dr. Charles Rice, en la Universidad de Washington (St. Louis, Missouri), un virólogo experto en el estudio de Flavivirus (familia *Flaviviridae*) como el virus de la fiebre amarilla, fue capaz de delinear el mapa de expresión de proteínas del virus descubierto recientemente por M. Houghton y para el que no existían modelos de infección, empleando para ello sistemas de expresión basados en virus Vaccinia o virus Sindbis recombinantes y sueros de pacientes convalecientes (21-25). Estos trabajos permitieron, entre otros, la identificación de dos proteasas virales NS3/4A y NS2, pero no permitían el estudio de elementos del genoma que no estuvieran directamente relacionados con el procesamiento de la poliproteína viral. Para dichos estudios de genética inversa, es decir, estudios donde se estudia el impacto de una mutación introducida experimentalmente en un gen en un determinado fenotipo, Rice disponía de la secuencia, más o menos completa del agente infeccioso, pero carecía de células susceptibles para el rescate de virus infeccioso, ya que el único modelo de infección experimental disponible era el chimpancé. Por ello, el grupo del Dr. Rice se puso manos a la obra para poder clonar la secuencia completa de virus presentes en el suero de chimpancés portadores de la infección crónica y para ello construyeron una serie de clones moleculares, para los que no tuvieron otra alternativa que inocular intrahepáticamente en el hígado de chimpancés no infectados. Así fue como, en 1997, el grupo de Rice y colaboradores publicó el rescate (producción de virus infeccioso a partir de DNA recombinante) de virus del hepatitis C infeccioso a partir de clones moleculares inoculados en forma de ARN transcrito in vitro en el hígado de chimpancés (26). Estos estudios llevaron a la propagación de virus infeccioso y a la transmisión de la patología (hepatitis) a los animales inoculados logrando por primera vez la demostración experimental de los requerimientos estructurales del genoma del virus de la hepatitis C necesarios para iniciar la infección (26). Estudios muy similares fueron llevados a cabo por el grupo del Dr. Jens Bukh (NIH), donde realizó experimentos análogos (27). Posteriormente el equipo del Dr. Bukh fue pionero en los estudios de genética inversa, al introducir mutaciones y deleciones deseadas en

dichos clones moleculares infecciosos, demostrando la relevancia funcional de la proteína p7 del virus de la hepatitis C (28).

Parecía evidente que la utilización de chimpancés para estudios de aspectos fundamentales de la biología de la infección por HCV no permitiría avanzar de una manera razonable y eficaz. Los fracasos a la hora de buscar líneas celulares que permitiesen la replicación de RNAs virales funcionales generados por diferentes grupos se contaban por decenas, ya que ningún grupo de investigación fue capaz de obtener y propagar virus infeccioso a partir de los clones moleculares que sí funcionaban en chimpancés. Esto llevó a grupos como los del Dr. Rice o del Dr. Bartenschlager (Universidad de Heidelberg) a tratar de recapitular aspectos parciales de la infección mediante la eliminación de elementos de RNA que pudieran ser prescindibles para la replicación del RNA viral, como la región correspondiente a las proteínas estructurales, presentes en el virión y la introducción de elementos de RNA que permitieran la selección de genomas y líneas celulares capaces de replicar eficazmente mediante aplicación de una presión selectiva en forma de antibiótico. Así, nacieron los replicones de HCV, elementos autorreplicativos de ARN di-cistrónicos basados en genomas delecionados y en la introducción de un gen de resistencia a neomicina y de un segundo cistrón bajo el control traduccional del IRES del virus de la encefalomiocarditis. Estos ARN subgenómicos y las líneas celulares portadoras resultantes constituyeron una auténtica revolución en el campo porque permitían por primera vez disponer de un modelo de cultivo celular para el estudio del virus de la hepatitis C y de la identificación y/o selección de líneas celulares hipersusceptibles (29). Estos trabajos de los equipos alemán y americano fueron publicados en el año 1999 y 2000 respectivamente, cambiando para siempre el estudio del virus de la hepatitis C (30) (31).

Una enorme producción científica basada en éstos y otros replicones similares hicieron avanzar el conocimiento de los aspectos más fundamentales de los determinantes genéticos del genoma del virus, al menos en sus aspectos de replicación de ARN viral y de sus interacciones con el hospedador. Sin embargo, a pesar de la identificación de líneas celulares que sostenían la replicación del RNA viral y la expresión de una replicasa funcional, la propagación de virus infeccioso en cultivo se resistía, con algunas excepciones en cultivos de hepatocitos primarios humanos.

Esta situación cambió con la identificación de una cepa muy particular del virus, la cepa JFH-1 (Japanese Fulminant Hepatitis 1) construida a partir de la secuencia consenso de los virus circulantes en un paciente japonés con hepatitis fulminante. La primera pista de que éste sería una cepa particular vino del hecho que la tasa de replicación del replicón subgenómico JFH-1 era excepcionalmente alta y de que los replicones podían establecerse incluso en líneas celulares no hepáticas, aunque con baja eficiencia



(32). Esto llevó al Dr. Wakita del Metropolitan Institute de Tokio y responsable de la caracterización inicial de los replicones a colaborar con diferentes equipos en el mundo para tratar de producir virus infeccioso gracias a un clon molecular completo de JFH-1. Se tomaron diversas estrategias, tanto la transfección de genomas completos de JFH-1 como de quimeras de la replicasa de JFH-1 con regiones estructurales de otros genotipos (33,34). En el caso del equipo del galardonado Dr. Rice, se empleó una quimera con otro virus del mismo genotipo, logrando el rescate de virus infeccioso tanto en cultivo celular como en modelos de infección con chimpancés (35,36). Otros grupos publicaron simultáneamente este hallazgo, que permitió por primera vez la propagación de HCV en cultivo celular (37). Estos estudios animaron a otros expertos a incrementar la capacidad replicativa de sus clones moleculares hasta forzar su propagación en cultivo celular mediante la introducción de mutaciones adaptativas. Gracias a estos clones moleculares infecciosos, se ha podido profundizar en el estudio tanto de aspectos básicos como más aplicados en el campo de la hepatitis C (38).

Si bien los clones moleculares infecciosos han sido muy importantes para la generación de conocimiento fundamental sobre el virus, los sistemas de replicón puestos a punto por los grupos del Dr. Rice y del Dr. Bartenschlager han sido instrumentales para que en la actualidad se esté considerando la erradicación del virus de la hepatitis C mediante terapias con antivirales de acción directa (39). La identificación de las actividades proteasa y polimerasa en NS3/4A (40) y NS5B respectivamente y la determinación de sus estructuras tridimensionales (41-43) permitió iniciar el camino para el diseño de compuestos antivirales frente a estas dianas virales (44). No obstante, los modelos de replicación en replicones han aportado varias ventajas adicionales. En primer lugar, permitieron validar compuestos seleccionados en ensayos enzimáticos *in vitro*, verificando que fueran efectivos en un sistema celular donde los complejos de replicación podrían no alcanzarse, al encontrarse en complejos de replicación membranosos dentro de la célula (45). En segundo lugar, los replicones permitieron acelerar el estudio de mecanismos de acción y de determinar los perfiles de resistencia a los fármacos. Esto se debe a la posibilidad de imponer una doble presión selectiva de manera experimental: i) sobre el gen marcador presente en el replicón para forzar la selección de replicones funcionales; ii) sobre la diana terapéutica viral, en presencia de cantidades crecientes de compuesto antiviral, de forma que se seleccionan replicones portadores de mutaciones de escape para dicho compuesto. Esto ha permitido determinar la barrera genética a resistencia frente a distintos fármacos, así como las mutaciones asociadas a resistencia, una información de gran relevancia clínica a la hora de diseñar las combinaciones de fármacos para los tratamientos (46).

Además, nuevas generaciones de replicones en los que el marcador del primer cistrón de los replicones ha sido sustituido por marcadores fácilmente medibles, como el gen de la luciferasa o de una proteína fluorescente, han permitido cribar colecciones de compuestos sin necesidad de conocer la diana molecular. En este sentido, los inhibidores más potentes en el arsenal terapéutico frente al HCV, han sido descubiertos mediante cribado en un sistema basado en fenotipo, no sesgado a ninguna de las dianas moleculares conocidas (47). Por ejemplo, estudios de perfil genético a resistencia llevaron a identificar a NS5A, una proteína multifuncional sin actividad enzimática conocida, como diana molecular de fármacos como daclatasvir o ledipasvir, esenciales en el tratamiento de la hepatitis C, pero sin un mecanismo molecular plenamente esclarecido a día de hoy (47).

El cambio de paradigma en el tratamiento de la hepatitis C vino dado por la aprobación de un inhibidor de la actividad polimerasa de NS5B, sofosbuvir, en forma de precursor del principio activo que aseguraba un enorme incremento en la eficacia de versiones anteriores de los inhibidores basados en nucleósidos modificados (48). Dicho antiviral de acción directa fue el primero en ser aprobado para su uso en ausencia de interferón en la terapia. La concepción y síntesis del sofosbuvir, la llevó a cabo el Dr. Sofía, lo que le valió junto a los desarrolladores de los replicones subgenómicos de HCV, los Dres. Rice y Bartenschlager el Premio Lasker en 2016 (<http://www.laskerfoundation.org/awards/show/hepatitis-c-replicon-system-and-drug-development/>). Sofosbuvir, en combinación con otros fármacos frente a la proteasa o NS5A anteriormente mencionados, permitió dejar atrás la era de los tratamientos basados en interferón, tratamientos largos, de baja eficacia y plagados de efectos secundarios, y abrir la era de los antivirales de acción directa (DAA), con tasas de éxito cercanas al 100% en todas las poblaciones tratadas con un tratamiento oral de 8-12 semanas (44,45). Este hecho ha llevado a la OMS a elaborar un plan ambicioso de erradicación del virus de la hepatitis C, con el objetivo de reducir la incidencia en un 80% y mortalidad asociada a hepatitis C en un 65% para el año 2030, con un amplio arsenal de antivirales de acción directa como única herramienta terapéutica. En España, se ha elaborado un Plan Estratégico Nacional para la eliminación de la hepatitis C en los que ya se han tratado unos 144.000 pacientes con una tasa de curación del 95% (<https://www.mscbs.gob.es/ciudadanos/enfLesiones/enfTransmisibles/-hepatitisC/PlanEstrategicoHEPATITISC/home.htm>).

A pesar de la calidad y cantidad de los DAA disponibles, el éxito de los planes de erradicación de la OMS pasan por la implementación de diversas políticas sanitarias que incluyen el control de calidad de los bancos de sangre así como políticas activas de reducción de daño en individuos adictos a drogas inyectables, entre



otras (49). No obstante, entre los principales desafíos a día de hoy se encuentra el de identificar, diagnosticar y tratar a los más de 30 millones de personas infectadas que no han sido diagnosticadas y que, por lo tanto, desconocen que están infectadas por el virus (49).

4. REFERENCIAS

- Foreman KJ, Marquez N, Dolgert A, Fukutaki K, Fullman N, McGaughey M, et al. Forecasting life expectancy, years of life lost, and all-cause and cause-specific mortality for 250 causes of death: reference and alternative scenarios for 2016-40 for 195 countries and territories. *Lancet* 2018; 392(10159):2052-90.
- Guidotti LG, Chisari FV. Immunobiology and pathogenesis of viral hepatitis. *Annu Rev Pathol* 2006; 1 (1):23-61.
- Wieland SF, Chisari FV. Stealth and cunning: hepatitis B and hepatitis C viruses. *J Virol* 2005; 15: 9369-80.
- Wong DT, Mihm MD, Boyer JL, Jain D. Historical Path of Discovery of Viral Hepatitis. *Harvard Medical Student Review* 2015; 3:18-36.
- Stokes JH. Epidemic infectious jaundice and its relation to the therapy of syphilis. *Archives of Internal Medicine American Medical Association* 1920; 1;26(5):521-43.
- Blumberg BS, Alter HJ, Visnich S. A "new" antigen in leukemia sera. *JAMA American Medical Association* 1965;191(7):541-6.
- Alter HJ, Holland PV, Purcell RH, Lander JJ, Feinstone SM, Morrow AG, et al. Posttransfusion hepatitis after exclusion of commercial and hepatitis-B antigen-positive donors. *Ann Intern Med.* 1972 ; 77(5):691-9.
- Feinstone SM, Kapikian AZ, Purcell RH. Hepatitis A detection by immune electron microscopy of a viruslike antigen associated with acute illness. *Science* 1973; 182(4116):1026-8.
- Feinstone SM, Kapikian AZ, Purcell RH, Alter HJ, Holland PV. Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B. *N Engl J Med.* 1975; 292(15):767-70.
- Alter HJ. The dominant role of non-A, non-B in the pathogenesis of post-transfusion hepatitis: a clinical assessment. *Clin Gastroenterol* 1980; 9(1):155-70.
- Houghton M. The long and winding road leading to the identification of the hepatitis C virus. *J Hepatol* 2009; 51(5):939-48.
- He LF, Alling D, Popkin T, Shapiro M, Alter HJ, Purcell RH. Determining the size of non-A, non-B hepatitis virus by filtration. *J Infect Dis.* 1987; 156(4):636-40.
- Feinstone SM, Mihalik KB, Kamimura T, Alter HJ, London WT, Purcell RH. Inactivation of hepatitis B virus and non-A, non-B hepatitis by chloroform. *Infect Immun. American Society for Microbiology Journals* 1983; 41(2):816-21.
- McCullagh KG, Davies JA, Sim IS, Dawson KM, O'Neill GJ, Doel SM, et al. Biological properties of human interferon beta 1 synthesized in recombinant bacteria. *J Interferon Res* 1983;3(1):97-111.
- Shimizu YK, Oomura M, Abe K, Uno M, Yamada E, Ono Y, et al. Production of antibody associated with non-A, non-B hepatitis in a chimpanzee lymphoblastoid cell line established by in vitro transformation with Epstein-Barr virus. *Proc Natl Acad Sci USA. National Academy of Sciences* 1985; 82(7):2138-42.
- Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989; 244(4902):359-62.
- Kuo G, Choo Q, Alter H, Gitnick G, Redeker A, Purcell R, et al. An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science* 1989; 244(4902):362-4.
- Alter HJ, Purcell RH, Shih JW, Melpolder JC, Houghton M, Choo QL, et al. Detection of antibody to hepatitis C virus in prospectively followed transfusion recipients with acute and chronic non-A, non-B hepatitis. *N Engl J Med* 1989; 321(22):1494-500.
- Chien DY, Choo QL, Tabrizi A, Kuo C, McFarland J, Berger K, et al. Diagnosis of hepatitis C virus (HCV) infection using an immunodominant chimeric polyprotein to capture circulating antibodies: reevaluation of the role of HCV in liver disease. *Proc Natl Acad Sci* 1992; 89(21):10011-5.
- Kleinman S, Alter H, Busch M, Holland P, Tegtmeyer G, Nelles M, et al. Increased detection of hepatitis C virus (HCV)-infected blood donors by a multiple-antigen HCV enzyme immunoassay. *Transfusion* 1992; 32(9):805-13.
- Grakoui A, Wychowski C, Lin C, Feinstone SM, Rice CM. Expression and identification of hepatitis C virus polyprotein cleavage products. *J Virol. American Society for Microbiology Journals* 1993; 67(3):1385-95.
- Lin C, Lindenbach BD, Prágai BM, McCourt DW, Rice CM. Processing in the hepatitis C virus E2-NS2 region: identification of p7 and two distinct E2-specific products with different C termini. *J Virol* 1994; 68(8):5063-73.
- Dubuisson J, Hsu HH, Cheung RC, Greenberg HB, Russell DG, Rice CM. Formation and intracellular localization of hepatitis C virus envelope glycoprotein complexes expressed by recombinant vaccinia and Sindbis viruses. *J Virol* 1994; 68(10):6147-60.
- Grakoui A, McCourt DW, Wychowski C, Feinstone SM, Rice CM. A second hepatitis C virus-encoded proteinase. *Proc Natl Acad Sci* 1993; 90(22):10583-7.
- Lin C, Rice CM. The hepatitis C virus NS3 serine proteinase and NS4A cofactor: establishment of a cell-free trans-processing assay. *Proc Natl Acad Sci* 1995; 92(17):7622-6.
- Kolykhalov AA, Agapov EV, Blight KJ, Mihalik K, Feinstone SM, Rice



- CM. Transmission of hepatitis C by intrahepatic inoculation with transcribed RNA. *Science* 1997; 277(5325):570–4.
27. Yanagi M, Purcell RH, Emerson SU, Bukh J. Transcripts from a single full-length cDNA clone of hepatitis C virus are infectious when directly transfected into the liver of a chimpanzee. *Proc Natl Acad Sci* 1997; 94(16):8738–43.
28. Sakai A, Claire MS, Faulk K, Govindarajan S, Emerson SU, Purcell RH, et al. The p7 polypeptide of hepatitis C virus is critical for infectivity and contains functionally important genotype-specific sequences. *Proc Natl Acad Sci* 2003; 100(20):11646–51.
29. Blight KJ, McKeating JA, Rice CM. Highly permissive cell lines for subgenomic and genomic hepatitis C virus RNA replication. *J Virol* 2002; 76(24):13001–14.
30. Lohmann V, Körner F, Koch J, Herian U, Theilmann L, Bartenschlager R. Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science* 1999; 285(5424):110–3.
31. Blight KJ, Kolykhalov AA, Rice CM. Efficient initiation of HCV RNA replication in cell culture. *Science* 2000; 290(5498):1972–4.
32. Kato T, Date T, Miyamoto M, Furusaka A, Tokushige K, Mizokami M, et al. Efficient replication of the genotype 2a hepatitis C virus subgenomic replicon. *YGAST* 2003; 125(6):1808–17.
33. Pietschmann T, Kaul A, Koutsoudakis G, Shavinskaya A, Kallis S, Steinmann E, et al. Construction and characterization of infectious intragenotypic and intergenotypic hepatitis C virus chimeras. *Proc Natl Acad Sci* 2006; 103(19):7408–13.
34. Wakita T, Pietschmann T, Kato T, Date T, Miyamoto M, Zhao Z, et al. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med* 2005; 11(7):791–6.
35. Lindenbach BD, Evans MJ, Syder AJ, Wölk B, Tellinghuisen TL, Liu CC, et al. Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science* 2005; 309(5734):623–6.
36. Lindenbach BD, Meuleman P, Ploss A, Vanwolleghe T, Syder AJ, McKeating JA, et al. Cell culture-grown hepatitis C virus is infectious in vivo and can be recultured in vitro. *Proc Natl Acad Sci* 2006; 103(10):3805–9.
37. Zhong J, Gastaminza P, Cheng G, Kapadia S, Kato T, Burton DR, et al. Robust hepatitis C virus infection in vitro. *Proc Natl Acad Sci* 2005; 102(26):9294–9.
38. Steinmann E, Pietschmann T. Cell Culture Systems for Hepatitis C Virus. In: Bartenschlager R, editor. *Hepatitis C Virus: From Molecular Virology to Antiviral Therapy*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2013. pp. 17–48. (Current Topics in Microbiology and Immunology; vol. 369).
39. Kim NG, Kullar R, Khalil H, Saab S. Meeting the WHO hepatitis C virus elimination goal: Review of treatment in paediatrics. *J Viral Hepat*. 2020; 27(8):762–9.
40. Grakoui A, McCourt DW, Wychowski C, Feinstone SM, Rice CM. Characterization of the hepatitis C virus-encoded serine proteinase: determination of proteinase-dependent polyprotein cleavage sites. *J Virol* 1993; 67(5):2832–43.
41. Kim JL, Morgenstern KA, Lin C, Fox T, Dwyer MD, Landro JA, et al. Crystal structure of the hepatitis C virus NS3 protease domain complexed with a synthetic NS4A cofactor peptide. *Cell* 1996; 87(2):343–55.
42. Lesburg CA, Cable MB, Ferrari E, Hong Z, Mannarino AF, Weber PC. Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase from hepatitis C virus reveals a fully encircled active site. *Nat Struct Biol* 1999; 6(10):937–43.
43. Bressanelli S, Tomei L, Roussel A, Incitti I, Vitale RL, Mathieu M, et al. Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci* 1999; 96(23):13034–9.
44. Lamarre D, Anderson PC, Bailey M, Beaulieu P, Bolger G, Bonneau P, et al. An NS3 protease inhibitor with antiviral effects in humans infected with hepatitis C virus. *Nature* 2003; 426(6963):186–9.
45. Moradpour D, Penin F, Rice CM. Replication of hepatitis C virus. *Nat Rev Micro* 2007; 5(6):453–63.
46. Bartenschlager R. Hepatitis C virus replicons: potential role for drug development. *Nat Rev Drug Discov* 2002; 1(11):911–6.
47. Gao M, Nettles RE, Belema M, Snyder LB, Nguyen VN, Fridell RA, et al. Chemical genetics strategy identifies an HCV NS5A inhibitor with a potent clinical effect. *Nature* 2010; 465(7294):96–100.
48. Sofia MJ. Beyond sofosbuvir: what opportunity exists for a better nucleoside/nucleotide to treat hepatitis C? *Antiviral Res*. 2014; 107:119–24.
49. Heffernan A, Cooke GS, Nayagam S, Thursz M, Hallett TB. Scaling up prevention and treatment towards the elimination of hepatitis C: a global mathematical model. *Lancet* 2019; 393(10178):1319–29.



EL PREMIO NOBEL EN QUÍMICA 2020

Juan-Ramón Lacadena

Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia

LA TÉCNICA CRISPR-Cas9: CRÓNICA DE UN PREMIO ANUNCIADO

En el año 2017 publiqué mis reflexiones sobre los aspectos científicos y éticos de la técnica CRISPR-Cas9 y en esa ocasión, como en muchas otras, vaticiné que, antes o después, sería objeto del premio Nobel. Y efectivamente, así fue: El 7 de octubre de 2020, la Real Academia de Ciencias de Suecia concedió el Premio Nobel en Química 2020 a las doctoras Emmanuelle Charpentier y Jennifer A. Doudna "por el desarrollo de un método para la edición genómica". Parafraseando el título de la famosa novela "Crónica de una muerte anunciada" del Premio Nobel Gabriel García Márquez, se hacía realidad la "crónica de un premio anunciado".

Como profesor de Genética, la noticia me ha alegrado mucho, pero me ha dejado un sabor agrídulce porque muchos pensábamos que cuando se diera el Premio Nobel a la técnica CRISPR-Cas9 de edición genómica también se debería incluir al científico español Francisco Juan Martínez Mojica que describió, estudió y bautizó las secuencias CRISPR en los genomas de arqueas y bacterias. CRISPR es el acrónimo de *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* (repeticiones palindrómicas cortas interespaçadas regularmente agrupadas) y *Cas* el acrónimo de *CRISPR associated* (asociada a CRISPR).

Por *edición genómica* se entiende un tipo de ingeniería genética en la que el ADN es insertado, eliminado o reemplazado en el genoma de un organismo utilizando enzimas del tipo nucleasas (denominadas "tijeras moleculares"). Las nucleasas producen roturas de doble cadena (*DSB*) en lugares precisos del genoma y las dobles roturas del ADN pueden ser reparadas por mecanismos de unión de extremos no homólogos (*NHEJ*) o mediante reparación dirigida por homología (*HDR*), dando lugar a mutaciones controladas (*edición*). La edición genómica se denomina coloquialmente como la técnica de "corta y pega". En la actualidad se dispone especialmente de cuatro tipos de nucleasas: *meganucleasas*, *nucleasas de dedo de zinc* (*ZF nuclease*), *Talen* (*Transcription Activator-Like Effector-based Nuclease*) y el sistema *CRISPR-Cas*.

Con la llegada de la técnica CRISPR-Cas9 puede decirse que se ha popularizado o "democratizado" el "tiro al blanco génico" (*gene target*). En efecto, mientras que la utilización de las meganucleasas necesitan 4-5 años de trabajo y un costo de 6.000 € para llevar a cabo una investigación de edición, las ZF nucleasas implican un costo 30.000 €, las TALEN implican un tiempo de 3-4 meses y un costo de 10.000 €, con la CRISPR-Cas9 se necesitan solamente 2-3 semanas de trabajo y un coste de 20-30 €.

Una breve historia de CRISPR-Cas9

Aunque la primera descripción de la existencia de las secuencias CRISPR en el genoma de las bacterias se hizo en 1987 por un grupo japonés, sin embargo se debe principalmente a los trabajos del investigador español Francisco Juan Martínez Mojica (Francis Mojica) (3, 4, 5) en los años 1993, 2000 y 2005 el estudio de unas secuencias de ADN repetidas (las secuencias CRISPR) descubiertas en bacterias y en arqueas—que posteriormente se descubrió su relación con el sistema inmunitario de la bacteria para defenderse de los ataques de los virus que las atacan— se han convertido en una de las herramientas biotecnológicas más eficaces para modificar el genoma (edición genómica) de cualquier clase de organismo. Sin embargo, fueron Emmanuelle Charpentier y Jennifer A. Doudna quienes se dieron cuenta que este sistema ancestral de defensa de las bacterias contra la infección por virus podía convertirse en una herramienta para la modificación dirigida del material genético de otros seres vivos.

La característica más relevante que diferencia a los métodos de corrección del ADN por transgénesis es que el transgén se integre al azar en el genoma o que se produzca el reemplazamiento del gen original. Por otro lado, una vez producida la doble rotura en la molécula de ADN puede haber dos rutas para fijar la rotura de la doble hélice: la *NHEJ* (unión de extremos no homólogos) que produce la disrupción génica (*INDEL*, inserciones y/o deleciones) y la *HDR* (reparación dirigida por homología) que da lugar a la reparación génica y a la edición.

El sistema CRISPR-Cas9 consta de dos elementos: una pequeña molécula de ARN (la parte CRISPR) que contiene una secuencia complementaria con la secuencia diana contra la que se dirige en el ADN, y una endonucleasa (denominada Cas9) que es una proteína con actividad enzimática capaz de cortar el ADN y hacerlo solamente donde le indique la pequeña molécula de ARN antes mencionada. Al producir la doble rotura en la molécula de ADN entran en acción otras enzimas existentes en las células que reparan el daño producido, pero que pueden generar errores al insertar o eliminar algunos nucleótidos en el lugar del corte; es decir, se genera una mutación en el gen afectado por el corte (*NHEJ*). Sin embargo, si se añade un tercer elemento al sistema CRISPR-Cas9 consistente en una molécula de ADN que tenga secuencias complementarias a la zona donde se producirá el corte y, además, se incorporan en esta secuencia algunos cambios específicos que no estuvieran en el genoma original, el sistema tenderá a utilizar esta molécula de ADN como molde para restaurar el corte cambiando así el genoma; es decir, editándolo (*edición genómica*). Como si de un procesador de textos se tratara, el sistema CRISPR-Cas9 y la molécula de ADN consiguen localizar un error y corregirlo en un gen o, viceversa, instaurar un error donde antes no lo había, reproduciendo así en un modelo animal experimental aquella mutación detectada en un paciente



afectado por una enfermedad. En otras palabras, somos capaces de reproducir en el genoma de los animales de experimentación las mismas mutaciones observadas en los pacientes.

En una revisión del tema, Lander (8) analizaba la contribución de diversos investigadores al desarrollo de los fundamentos y aplicaciones de la técnica CRISPR-Cas9. Los 12 “héroes CRISPR” — como él los llama— son, por orden de aparición en escena:

- Descubrimiento de CRISPR: Francisco Juan Martínez Mojica (1993)
- CRISPR es un sistema inmune adaptativo: F.J.M. Mojica (2005), Gilles Vergnaud (2005), Alexander Bolotin (2005)
- Evidencia experimental de que CRISPR confiere inmunidad adaptativa y utiliza una nucleasa: Philippe Horvath (2007)
- Programando CRISPR: John van der Oost (2008)
- Dianas CRISPR en el ADN: Luciano Marrafini (2008)
- Cas9 es guiada por crRNAs y crea dobles roturas en el ADN: Sylvain Moineau (2008)
- Reconstituyendo CRISPR en un organismo distante: Virginijus Siksnys (2011)
- Estudiando CRISPR in vitro: V. Siksnys (2012), Emmanuelle Charpentier (2012), Jennifer A. Doudna (2012)
- Edición genómica en células de mamíferos: Feng Zhang (2012, 2013), George Church (2013)

De los doce investigadores citados, hay cinco especialmente cualificados para ser merecedores del galardón Nobel que, por orden de aparición en escena —como se dice en los programas de representaciones teatrales— son los doctores Mojica, Charpentier, Doudna, Zhang y Church. Como las normas de concesión de los galardones dicen que no sean más de tres personas (a no ser que se trate de alguna organización), la Real Academia de Ciencias de Suecia, que otorga el Premio Nobel en Química, se vio en la necesidad de aplicar un juicio salomónico, a mi juicio equivocado, premiando solamente a Emmanuelle Charpentier y a Jennifer A. Doudna. En mi opinión, sin los descubrimientos básicos de la secuencia CRISPR que hizo el Dr. Mojica, las galardonadas con el Premio Nobel no hubieran podido desarrollar su técnica premiada y, por tanto, el Dr. Mojica debería haberles acompañado en el galardón. En la historia de los Premios Nobel, hay casos similares en los que se premiaba también la investigación básica que, muchos años después, servía de base a los trabajos de los premiados. En elegantes palabras del excluido Dr. Mojica, “han premiado a las personas que desarrollan la herramienta. No a quien sentó las bases [él mismo] ni a quienes primero la aplicaron [George Church y Feng Zhang]”.

Un comentario final: la Genética y los Premios Nobel

Una vez más, investigaciones genéticas —en este caso, año 2020, las llevadas a cabo por los Dres. Houghton y Rice con el virus de la hepatitis C y las de las Dras. Charpentier y Doudna con la técnica

CRISPR-Cas9— han sido galardonadas con el Premio Nobel. Utilizando palabras similares a las que usé en anteriores ocasiones semejantes a ésta, puedo señalar globalmente que investigaciones genéticas han sido galardonadas con el Premio Nobel en 56 ocasiones, correspondiendo el premio a 110 científicos del campo de la Genética o ciencias afines. De los 56 premios considerados, 42 pertenecen al ámbito de la Fisiología o Medicina, 13 a la Química y 1 de la Paz. De los 110 científicos galardonados, 83 corresponden a premios de Fisiología o Medicina, 26 de Química y 1 de la Paz. Sólo hay 10 mujeres entre los galardonados.

Me siento orgulloso de pensar que en los veinte años que van transcurridos del siglo XXI se ha premiado la investigación genética en 22 ocasiones, a saber: 2001, 2002, 2004, 2006, 2006, 2007, 2008, 2008, 2009, 2009, 2010, 2011, 2012, 2013, 2013, 2016, 2017, 2018, 2018, 2019, 2020, 2020.

REFERENCIAS

1. Lacadena JR. Edición genómica: Ciencia y Ética. Revista Iberoamericana de Bioética (online), Genética y Humanismo 2017; 3: 1-14. Basado en Montoliu L. Las herramientas CRISPR: Un regalo inesperado de las bacterias que ha revolucionado la biotecnología animal. <http://www.comunicabiotec.org> 2015 y en Serrugia D, Montoliu L. The new CRISPR-Cas system: RNA-guided genome engineering to efficiently produce any desired genetic alteration in animals. *Transgenic Res* 2014; 23:707-716.
2. Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M, Nakata A. Nucleotide sequence of the *iap* gen, responsable for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gen product. *J Bacteriol* 1987; 169:5429-33.
3. Mojica FJM, Juez G, Rodríguez-Valera F. Transcription at different salinities of *Haloferax mediterranei* sequences adjacent to partially modified *PatI* sites. *Mol Microbiol* 1993; 9:613-21.
4. Mojica FJ, Díez-Villaseñor C, Soria E, Juez G. Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria. *Mol Microbiol* 2000; 36:244-6.
5. Mojica FJ, Díez-Villaseñor C, García-Martínez J, Soria E. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *J Mol Evol* 2005; 60:174-84.
6. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 2012; 337:816-21.
7. Montoliu L. Las herramientas CRISPR: Un regalo inesperado de las bacterias que ha revolucionado la biotecnología animal. Recuperado de <http://www.comunicabiotec.org> 2015.
8. Lander ES. The Heroes of CRISPR. *Cell* 2016; 164:18-28.