

El premio Nobel de Fisiología o Medicina 2008: deshaciendo el nudo gordiano. El premio Nobel de Química 2008: otra herramienta genética al servicio de la ciencia

Juan-Ramón Lacadena Calero

Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia

Un año más, la Real Academia Nacional de Farmacia se reúne en Sesión Científica pública para conmemorar la concesión de los Premios Nobel de Fisiología o Medicina y de Química que tienen que ver con los intereses científicos de nuestra institución.

1. EL PREMIO NOBEL DE FISIOLOGÍA O MEDICINA 2008

El 6 de octubre de 2008 la Asamblea Nobel del Instituto Karolinska hacía pública la concesión del Premio Nobel 2008 en Fisiología o Medicina al Dr. Harald zur Hausen (Centro Alemán de Investigación en Cáncer, Heidelberg) “por su descubrimiento de los virus de papiloma humano causantes del cáncer cervical” y a la Dra. Françoise Barré-Sinoussi (Departamento de Virología, Instituto Pasteur, París) y al Dr. Luc Montagnier (Fundación Mundial para la Investigación y Prevención del SIDA, París) por “su descubrimiento del virus de inmunodeficiencia humana”.

1.1. El virus del papiloma humano (HPV) y el cáncer cervical

En relación con el descubrimiento del Dr. zur Hausen cabe destacar cómo sus investigaciones iban contra corriente frente a la opinión mayoritaria de la comunidad científica en la década de los setenta del siglo pasado que atribuía el cáncer cervical –que supone el segundo más frecuente entre los distintos tipos de cáncer que sufren

las mujeres– al virus de tipo herpes simplex. En 1974, zur Hausen publicó su primer intento de encontrar ADN del virus de papiloma humano (HPV) en biopsias de cáncer cervical (1), llegando más tarde a sospechar de la heterogeneidad genética de diversos tipos de virus HPV (2). Sin embargo, fue a principios de la década de los ochenta, cuando el grupo de investigación del Dr. zur Hausen (3, 4) encontró que dos variantes del virus del papiloma humano (las HPV16 y HPV18) estaban presentes en más del 80% de los casos de cáncer cervical. Además, sus investigaciones contribuyeron al conocimiento del mecanismo de la carcinogénesis inducida por el HPV y los factores que predisponen la persistencia viral y la transformación celular. Todo ello ha permitido el desarrollo de vacunas profilácticas que garantizan más de un 95% de protección frente al cáncer cervical producido por los subtipos 16 y 18 del HPV.

Para magnificar la trascendencia de las investigaciones llevadas a cabo por el grupo del Dr. zur Hausen, la nota de prensa de la institución Karolinska señala que más del 5% de todos los cánceres humanos son causados por la infección persistente con virus de papiloma y que la infección con este virus es el de mayor transmisión sexual, afectando al 50-80% de la población. De los más de 100 tipos de HPV conocidos, unos 40 infectan el tracto genital y de ellos 15 suponen un alto riesgo de cáncer cervical para la mujer. El virus del papiloma humano se puede detectar en el 99,7% de mujeres con cáncer cervical histológicamente confirmado, afectando a medio millón de nuevos casos al año en todo el mundo que producen la muerte de 250.000 mujeres cada año.

1.2. El virus de inmunodeficiencia humana: deshaciendo el nudo gordiano

Hace unos años escribía yo un comentario sobre los “Fraudes científicos: Ética de la investigación” en el que recogía las siguientes palabras (5):

“En la década de los ochenta del siglo pasado, fue muy notable la controversia establecida entre el Dr. Robert Gallo, del Instituto Nacional del Cáncer en Bethesda, USA, y el Dr. Luc Montagnier, del Instituto Pasteur de París, sobre la paternidad de la identificación del virus responsable del SIDA (el HIV, por *Human Immunodeficiency*

Virus). Finalmente, Gallo reconoció que ‘probablemente’ algunos cultivos de su laboratorio se habían contaminado con una muestra viral enviada por el Dr. Montagnier. Aunque en 1987 llegaron ambos científicos al acuerdo de repartirse en un 50% la gloria del descubrimiento, es muy posible que la situación creada haga inviable la posibilidad de que reciban el Premio Nobel que el descubrimiento bien merecía”.

Afortunadamente me equivoqué porque la Asamblea Nobel del Instituto Karolinska ha roto el nudo gordiano de forma muy diplomática acogiéndose a las normas institucionales que, de no tratarse de un premio otorgado a un colectivo, impiden galardonar con el premio a más de tres personas en el mismo año. Así, al otorgar la mitad del premio al Dr. zur Hausen por su investigación en los virus del poliovirus causantes del cáncer de cuello de útero y la otra mitad simultáneamente a los doctores Barré-Sinoussi y Montagnier por su investigación sobre el virus de la inmunodeficiencia humana ya no cabía el Dr. Robert Gallo.

En 1981 se describió en California y Nueva York un nuevo y preocupante síndrome que presentaban grupos de hombres jóvenes que previamente habían estado sanos y cuyos síntomas clínicos no se habían encontrado previamente en dicha población. En 1982, un grupo de trabajo dirigido por los Centros para el Control de Enfermedades (CDC Task Force) definió la nueva enfermedad como “síndrome de deficiencia inmune adquirida” (AIDS) (6). Posteriormente el CDC concluyó que el AIDS se extendía globalmente especialmente en poblaciones de homosexuales y de consumidores de drogas por vía intravenosa, pero que también se daban casos entre heterosexuales, hemofílicos e inmigrantes procedentes de Haití. La inmunodeficiencia se asoció con la rápida eliminación de células T CD4⁺ y de células presentadoras de antígeno. Como evidencia de la eficacia de la investigación científica y clínica, en dos años se logró identificar la causa del AIDS.

Volviendo a la controversia sobre la exclusión del Dr. Gallo del Premio Nobel, el nudo gordiano científico no se rompió de un tajo de espada como dice la leyenda que Alejandro Magno hizo con el nudo del rey Gordias de Frigia, sino deshaciéndolo con paciencia, siguiendo paso a paso, cronológicamente, todas las investigaciones. Para justificar de alguna manera, si cabe, el desengaño que habrá sufrido sin duda el Dr. Robert Gallo al verse excluido del galardón, en la extensa exposición

científica que hace del descubrimiento la Asamblea Nobel del Instituto Karolinska dice muy claramente que en 1983 Barré-Sinoussi y Montagnier concluyeron que habían descubierto un nuevo retrovirus humano no-transformante que contenía una proteína principal p25 (7), similar a la del virus HTLV-1 (*human T-cell leukemia virus*) que en 1981 y 1983 había descubierto el grupo de Gallo (8, 9), pero con diferentes propiedades antigénicas. Este nuevo tipo de virus fue denominado “virus asociado con linfadenopatía (LAV)”. Más tarde, en 1984, Barré-Sinoussi y Montagnier aislaban en dos hermanos con hemofilia B tratados con factor VIII otros virus similares al LAV que denominaron “virus asociados con la inmunodeficiencia” (IDAV-1, IDAV-2) que presentaban una morfología típica de lentivirus tipo D (con un espacio interno cónico-cilíndrico claramente distinto del espacio interno esférico de los virus HTLV-I y HTLV-II) y una proteína p25 idéntica a la de LAV (10). En 1984, Gallo y colaboradores (11-14) describían un nuevo tipo de virus semejante a los HTLV que compartía algunas propiedades con los HTLV-1 y HTLV-2, denominándolo HTLV-III que, sin embargo, presentaba mucha similitud con el LAV-1 de Barré-Sinoussi y Montagnier. Posteriormente, el grupo del Dr. Levy en San Francisco identificó en pacientes con SIDA y con linfadenopatía otro retrovirus del tipo D, del grupo lentivirus, estructuralmente relacionado con el LAV-1 y el HTLV-III (15). Finalmente, los grupos americanos y francés se pusieron de acuerdo en que LAV-1/IADV-1/HTLV-III y ARV eran el mismo tipo de virus, de manera que en 1985 un consorcio internacional de taxonomía viral decidió la denominación definitiva de “virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (HIV-1)” (16-18). ¿Cómo habría que interpretar el hecho de que Gallo reconociera que “probablemente” algunos cultivos de su laboratorio se habían contaminado con una muestra viral enviada por el Dr. Montagnier, tal como recogía al principio de este escrito?

Apropiaciones indebidas en el ámbito científico las ha habido siempre en cualquier disciplina. Podríamos recordar, en el ámbito de los Premios Nobel, la controversia surgida en torno a James D. Watson y Francis H. C. Crick en relación con la forma en que conocieron los datos de Rosalind Franklin sobre la difracción por rayos X de la molécula de ADN que les permitió ganar la carrera del modelo estructural del ADN.

En 1962, Watson y Crick recibieron, junto a Maurice H.F. Wilkins, el Premio Nobel en Fisiología o Medicina “por sus descubrimientos

en relación con la estructura molecular de los ácidos nucleicos y su significación para la transmisión de la información en la materia viva". El artículo original de Watson y Crick de 1953 apareció "escoltado" por dos trabajos sobre modelos de difracción por rayos X realizados por Wilkins y colaboradores y por Rosalind E. Franklin. Watson tenía 25 años cuando se publicó el modelo estructural. Desgraciadamente, Rosalind Franklin, que sin duda alguna hubiera sido merecedora también del premio, había fallecido en 1958 de cáncer de ovario, a los 37 años de edad.

En el libro "*La doble hélice*" escrito por Watson (19), el autor narra de forma autobiográfica sus experiencias vitales en torno al descubrimiento de la estructura del ADN, poniendo de manifiesto las intrigas, insidias y los manejos poco limpios del mundo científico. En esta obra se pueden encontrar, junto a páginas y hechos estimulantes, situaciones en las que la competitividad puede llevar a comportamientos no éticos. La cuestión ética que se plantea en relación con el descubrimiento de la doble hélice tiene que ver con el papel que jugó Rosalind Franklin en el descubrimiento del modelo. Watson y Crick tuvieron acceso, sin el conocimiento y autorización de Rosalind Franklin, de una fotografía que había obtenido ella sobre el modelo de difracción con rayos X del ADN que resultó clave para que aquellos pudieran proponer su modelo estructural de la doble hélice.

Watson y Crick realizaron su trabajo en el Cavendish Laboratory de Cambridge, mientras que Wilkins y Franklin lo llevaron a cabo en el King's College de Londres, donde uno de los edificios lleva el nombre "Franklin-Wilkins". Como dice su biógrafa Brenda Maddox (20), Rosalind Franklin nunca pudo imaginar que se dedicara en su honor un edificio en el King's Collage, donde pasó los dos años más desgraciados de su carrera profesional. Por otro lado, como recuerdo y homenaje a esta científica se ha creado la *Medalla Rosalind Franklin* para premiar a investigadoras del Reino Unido, en un intento de restañar las heridas del pasado. Rosalind Franklin se ha convertido en un icono feminista de la investigación.

De forma anecdótica, en este contexto me viene a la memoria el caso de la variedad de trigo española "Dimas" que, al parecer, fue producto de una "distracción" de semillas de la variedad francesa "Etoile de Choisy". Para mayor sarcasmo, el nombre de la variedad españo-

la responde al del “buen ladrón” del relato evangélico de la crucifixión. Cuando se discute acaloradamente sobre si “patentes, sí” o “patentes, no”, hay que tener presente que las patentes protegen los derechos legítimos de los investigadores y los centros de investigación públicos o privados.

2. EL PREMIO NOBEL DE QUÍMICA 2008: UNA HERRAMIENTA GENÉTICA AL SERVICIO DE LA CIENCIA

El 8 de octubre, la Real Academia Sueca de Ciencias comunicaba su decisión de otorgar el Premio Nobel en Química 2008 conjuntamente a los doctores Osamu Shimomura (Marine Biological Laboratory, Woods Hole, MA, y Boston University Medical School, USA), Martin Chalfie (Columbia University, New York, USA) y Roger Y. Tsien (University of California, San Diego, La Jolla, USA) por “el descubrimiento y desarrollo de la proteína fluorescente verde, GFP”.

2.1. La importancia de la herramienta

Como tuve ocasión de recordar en mi discurso de ingreso en esta Real Academia al analizar el desarrollo de la Genética desde la perspectiva de los premios Nobel concedidos a lo largo de la historia de la institución Nobel (21), la regla de oro de la investigación se sustenta en tres apoyos: la pregunta importante que se trata de responder, en qué material biológico y con qué técnicas se puede abordar la investigación. El premio Nobel concedido a Shimomura, Chalfie y Tsien se enmarca dentro de este último apartado: la proteína fluorescente verde (GFP) ha resultado ser una herramienta poderosísima en la investigación genética. Como decía la nota de prensa de la Real Academia Sueca de Ciencias, la GFP descrita por vez primera en 1962 por el Dr. Shimomura (22) en la medusa *Aequorea victoria* ha llegado a ser uno de los instrumentos más importantes de la investigación en biociencia actual porque “permite el análisis a nivel molecular de los procesos espacio-temporales intra- e intercelulares que definen el comportamiento dinámico de todos los sistemas vivientes” (23) (Ehrenberg, 2008). Aunque el trabajo inicial de Shimomura estaba enfocado hacia la proteína responsable de la bioluminiscencia de la

medusa que denominó *aequorina*, sin embargo mencionaban también en su trabajo que habían aislado otra proteína que era ligeramente verdosa a la luz del sol, amarillenta bajo luz incandescente y verde fluorescente bajo luz ultravioleta. En un principio la llamaron “proteína verde” a secas; la denominación de “proteína fluorescente verde” fue posterior. Más adelante, Shimomura demostró que la GFP -que es una proteína de 238 aminoácidos- contiene un cromóforo especial que al ser excitado por la luz azul o la luz ultravioleta emite luz en la longitud de onda verde. Esto explica que en la medusa *Aequora victoria* el cromóforo de la GFP simplemente transforma la luz azul de la proteína *aequorina* en luz verde. Pero lo más importante del caso es que, a diferencia del comportamiento de la *aequorina* y otras proteínas bioluminiscentes que necesitan el suministro continuo de moléculas ricas en energía, a la GFP le basta con la luz UV o la luz azul para fluorecer. Cuando la luz entra en las células y encuentra a la GFP se produce la fluorescencia verde sin necesidad de tener que introducir en la célula producto químico alguno que pudiera disturbar los procesos que ocurren en su interior. Shimomura (24) clarificó la estructura química del cromóforo de la GFP que está formado por los aminoácidos de las posiciones 65, 66 y 67 (Ser-Tyr-Gly) que reaccionan químicamente entre sí para formar el cromóforo fluorescente que resulta ser la p-hidroxibenciliden-imidazolinona que tiene su máximo de excitación a 400 nm y el máximo de emisión a los 505 nm.

El anuncio del galardón Nobel justificaba el premio “por el descubrimiento y desarrollo de la proteína fluorescente verde, GFP”. Efectivamente, Shimomura descubrió la GFP, pero casi treinta años después los doctores Martin Chalfie y Roger Y. Tsien desarrollaron su aplicación como herramienta genética que permite visualizar procesos hasta ahora invisibles al ojo humano. Hoy día la GFP se ha entendido a otras formas procedentes de diferentes organismos y variantes genéticamente manipuladas que constituyen las proteínas de la “familia GFP” que permiten monitorizar los más variados procesos de las células y organismos vivos como son, entre otros, la expresión génica, la localización y dinámica de las proteínas, las interacciones proteína-proteína, la división celular, la organización y replicación cromosómicas, las rutas de transporte intracelular y la biogénesis y transmisión de orgánulos.

Fue en 1988 cuando Chalfie oyó hablar por vez primera de la GFP en un seminario sobre organismos bioluminescentes que tuvo lugar en

la Columbia University, cayendo en la cuenta de que la GFP podía ser de gran utilidad en sus estudios con el nematodo *Caenorhabditis elegans* que había iniciado en su estancia postdoctoral en el laboratorio de Sydney Brenner, premio Nobel en Fisiología o Medicina 2002. La idea de Chalfie era conectar el gen de la GFP con genes reguladores o con genes que codifican para otras proteínas. Para ello utilizó el gen *gfp* aislado en 1992 por Prasher y colaboradores (25) y al clonarlo en *Escherichia coli* le permitió demostrar que la GFP no necesitaba de otras proteínas para producir el cromóforo. Posteriormente, Chalfie y colaboradores (26, 27) lograron unir el gen de la GFP al promotor de un gen que es activo en seis neuronas de receptores de contacto de *C. elegans*. Lo importante es que, cuando el gen de la GFP se une al de otra proteína que se quiere estudiar en algún organismo, dicha proteína no pierde su actividad normal a la vez que la GFP mantiene su fluorescencia, de manera que se puede seguir la localización, movimiento e interacciones de la proteína dentro del organismo mediante monitorización con el microscopio.

A partir de aquí es cuando entra en escena el Dr. Tsien cuyo mérito indudable ha sido el de ampliar la “paleta de colores” disponible para el investigador mejorando, además, la intensidad y duración de su brillo. Tsien y colaboradores (28) estudiaron cómo la formación del cromóforo fluorescente en la GFP ocurre postraduccionalmente con el oxígeno molecular como único factor auxiliar. Asimismo, manipulando el ADN del gen GFP, el grupo de Tsien obtuvo nuevas variantes de GFP que aumentaban la intensidad del brillo y producían la aparición de nuevos colores (azul, amarillo, etc.) (29-31), destacando también sus importantes contribuciones para lograr el desarrollo de variantes de las proteínas fluorescentes rojas a partir de la “proteína fluorescente DsRed” procedente del coral *Discosoma* (32). (Para revisiones sobre el trabajo de Tsien y colaboradores ver 33-35). Como decía un comentarista de la institución Nobel, “46 años después de que Shimamura publicara su trabajo sobre la GFP, hay un caleidoscopio de proteínas “GFP-like” que brillan con todos los colores del arco iris”.

Como señalaba la nota de prensa de la Real Academia Sueca de Ciencias, “los investigadores pueden analizar el daño de las células nerviosas en la enfermedad de Alzheimer o cómo se originan las células beta productoras de insulina en el páncreas durante el desarrollo del embrión o las células nerviosas del cerebro”. Aplicaciones espec-

taculares de estas técnicas son, por ejemplo, el denominado “cerebro-arco iris” (*brainbow*) de ratones genéticamente modificados que producen distintas coloraciones (amarillo, azul oscuro y rojo) en las células nerviosas del cerebro, lo cual permite seguir la pista de la fibras nerviosas desde células individuales en la intrincada red cerebral.

Por mi afición a relacionar los dichos y refranes con la Genética (36), permítaseme en este contexto académico hacer referencia al conocido dicho “dígaselo con flores” que puede ser parafraseado por el de “dígaselo con genes”, teniendo en cuenta la aplicación de las técnicas de ingeniería genética molecular que permiten modificar los colores naturales de las flores (por ejemplo, la obtención de rosas azules) o cuando se utiliza la expresión “es más raro que un perro verde” que hoy, con la manipulación genética del gen de la proteína fluorescente verde no nos causaría extrañeza si recordamos que ya estamos acostumbrados a ver “ratones verdes” en el laboratorio. Además, al tener en cuenta cómo la GFP hace visibles a las proteínas a las que se une tras la manipulación genética, me viene a la memoria el dicho “dime con quién andas y te diré quién eres”.

Finalmente hay que señalar la posible aplicación biotecnológica de la GFP como es su utilización como sensores de arsénico y metales pesados. Por ejemplo, se han obtenido bacterias genéticamente modificadas resistentes al arsénico que fluorescen en verde en su presencia y otros organismos que permiten detectar la presencia de cinc y cadmio o incluso explosivos (TNT).

3. EPÍLOGO

Hoy, en 2008 como sucediera en años anteriores, podemos estar orgullosos los amantes de la Genética porque ya son 36 las veces en que el galardón Nobel ha correspondido a 78 científicos del campo de la Genética o ciencias afines. De los 36 premios considerados, 28 pertenecen al ámbito de la Fisiología o Medicina, 7 a la Química y 1 de la Paz y, a su vez, de los 78 científicos galardonados, 62 corresponden a premios de Fisiología o Medicina, 15 de Química y 1 de la Paz. Por cierto que, de estos 78 científicos, ¡solamente 4 de ellos son mujeres!: Barbara McClintock (1983), Christiane Nüsslein-Volhard (1995), Linda S. Buck (2004) y Françoise Barré-Sinoussi (2008), lo

cual supone un poco más del 5%. En 2007 tuve la oportunidad de hacer una actualización de la historia “nobelada” de la Genética que, como se ha mencionado anteriormente, fue mi discurso de ingreso en esta Real Academia (37).

Finalmente, me gustaría destacar que en lo que va de década se ha premiado la investigación genética en ocho ocasiones: 2001 (Hartwell, Hunt y Nurse, “por sus descubrimientos de los reguladores clave del ciclo celular”), 2002 (Brenner, Horvitz y Sulston, “por sus descubrimientos sobre la regulación genética del desarrollo de los órganos y la muerte celular programada”), 2004 (Axel y Buck, “por sus descubrimientos de receptores olorosos y la organización del sistema olfativo”), 2006 (Fire y Mello, “por su descubrimiento de la interferencia por ARN: silenciamiento de genes por ARN de doble cadena”), 2006 (Kornberg, “por sus estudios de la base molecular de la transcripción eucariótica”), 2007 (Capecchi, Evans y Smithies, “por sus descubrimientos de los principios para introducir modificaciones génicas específicas en ratones mediante el uso de células troncales embrionarias”), 2008 (zur Hausen, “por su descubrimiento de los virus del papiloma humano causantes del cáncer cervical”; Barré-Sinoussi y Montagnier, “por su descubrimiento del virus de la inmunodeficiencia humana”) y 2008 (Shimomura, Chalfie y Tsien, “por el descubrimiento y desarrollo de la proteína fluorescente verde, GFP”). Sin duda, es una década prodigiosa para la Genética.

Finalmente, si se me permite hacer alguna profecía, yo me atrevo a sugerir que, antes o después, los grandes pioneros de la Genómica (¿Venter, Collins?) y la reprogramación celular (¿Wilmut, Yamanaka, Thomson?) serán galardonados con el premio Nobel. ¡Ojalá tengamos ocasión de recordar estas palabras mías en una ulterior sesión científica de esta Real Academia Nacional de Farmacia!

4. BIBLIOGRAFÍA

1. Zur Hausen, H., Meinhof, W., Scheiber, W. & Bornkamm, G.W. (1974) Attempts to detect virus-specific DNA in human tumors. I. Nucleic acid hybridizations with complementary RNA of human wart virus. *Int. J. Cancer*. 13: 650-656.
2. Gissmann, L. & zur Hausen, H. (1976) Human papilloma virus DNA: physical mapping and genetic heterogeneity. *PNAS*. 73: 1310-1313.

3. Durst, M., Gissmann, L., Ikenberg, H. & zur Hausen, H. (1983) A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. *PNAS*. 80: 560-563.
4. Boshart, M., Gissmann, L., Ikenberg, H., Kleinheinz, A., Scheurlen, W. & zur Hausen, H. (1984) A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsias and in cell derived from cervical cancer. *EMBO J.* 3: 1151-1157.
5. Lacadena, J.R. (2006) Fraudes científicos: Ética de la investigación, *Pági-ina web "Genética y Bioética", Centro Nacional de Información y Comunicación Educativa (CNICE), MEC*, <http://w3.cnice.mec.es/tematicas/genetica>
6. Cdc Task Force on Kaposi's Sarcoma and Opportunistic Infections (1982) Epidemiologic aspects of the current outbreak of Kaposi's sarcoma and opportunistic infections. *N. Engl. J. Med.* 306: 248-252.
7. Barré-Sinoussi, F., Cherman, J.C., Rey, F., Nugeyre, M.T., Chamaret, S., Gruest, J., Dauguet, C., Axler-Blin, C., Vézinet-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.
8. Rho, H.M., PoiesZ, B., Ruscetti, F.W. & Gallo, R.C. (1981) Characterization of the reverse transcriptase from a new retrovirus (HTLV) produced by a human cutaneous T-cell lymphoma cell line. *Virology*. 112: 355-360.
9. Gallo, R.C., Popovic, M., et al. (1983) Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*. 220: 865-867.
10. Vilmer, E., Barré-Sinoussi, F., Rouzioux, C., Gazengel, C., Brun, F.V., Dauguet, C., Fischer, A., Manigne, P., Cherman, J.C., Griscelli, C. & Montagnier, L. (1984) Isolation of new lymphotropic retrovirus from two siblings with haemophilia B, one with AIDS. *Lancet*. 1: 753-757.
11. Popovic, M., Sarnghadharan, M.G., Read, E. & Gallo, R.C. (1984) detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. *Science*. 224: 497-500.
12. Gallo, R.C., Salahuddin, S.Z., Popovic, N., et al. (1984) Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science*. 224: 500-503.
13. Schüpbach, J., Popovic, M., Gilden, R.V., Gonda, M.A., Sarnghadharan, M.G. & Gallo, R.C. (1984) Serological analysis of a subgroup of human T-lymphotropic retroviruses (HTLV-III) associated with AIDS. *Science*. 224: 503-505.
14. Sarnghadharan, M.G., Popovic, M., Bruch, L., Schüpbach, J. & Gallo, R.C. (1984) Antibodies reactive with human T-lymphotropic retroviruses (HTLV-III) in the serum of patients with AIDS. *Science*. 224: 506-508.
15. Levy, J.A., Hoffman, A.D., Kramer, S.M., Landis, J.A., Shimabukuru, J.M. & Oshiro, L.S. (1984) Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS. *Science*. 225: 840-842.
16. Wain-Hobson, S., Alizon, M. & Montagnier, L. (1985) Relationship of AIDS to other retroviruses. *Nature*. 313: 743.
17. Ratner, L., Gallo, R.C. & Wong-Staal, F. (1985) HTKV-III, LAV, ARV are variants of same AIDS virus. *Nature*. 313: 636-637.
18. Coffin, J., Haase, A., Levy, J.A., Montagnier, L., Temin, H.M. & Varmus, H.J. (1986) What to call the AIDS virus? *Nature*. 321: 10-12.

19. Watson, J.D. (1968) The double helix. Weidenfeld and Nicolson, London, (traducido al español con el título "La doble hélice").
20. Maddox, B. (2003) The double helix and the "wronged heroine". *Nature*. 421: 407-408.
21. Lacadena, J.R. (1995) Historia "nobelada" de la Genética: Concepto y método. Discurso de Ingreso en la Real Academia de Farmacia, Madrid, pp. 7-76.
22. Shimomura, O., Johnson, F.H. & Saiga, Y. (1962) Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusa, *Aequorea*. *J. Cell. Comp. Physiol.* 59: 223-229.
23. Ehrenberg, M. (2008) The green fluorescent protein: discovery, expression and development. Information Department, The Royal Swedish Academy of Sciences.
24. Shimomura, O. (1979) Structure of the chromophore of *Aequorea* green fluorescent protein. *FEBS Letter*. 104: 220-222.
25. Prasher, D., Eckenrode, V.K., Ward, W.W., Pendergast, F.G. & Cormier, M.J. (1992) Primary structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Gene*. 111: 229-233.
26. Chalfie, M. et al. (1993) A new method of looking at *C. elegans* gene expression. *Worm Breeder's Gazette*, 13 (1) (October 1).
27. Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W.W. & Prasher, D.C. (1994) Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*. 263: 802-805.
28. Heim, R., Prasher, D.C. & Tsien, R.Y. (1994) Wavelength mutations and posttranslational autooxidation of green fluorescent protein. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 91: 12501-12504.
29. Heim, R., Cubitt, A. & Tsien, R.Y. (1995) Improved green fluorescence. *Nature*. 373: 663-664.
30. Heim, R. & Tsien, R.Y. (1996) Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelengths and fluorescence resonance energy transfer. *Curr. Biol.* 6: 178-182.
31. Tsien, R.Y. (1998) The green fluorescent protein. *Annu. Rev. Biochem.* 67: 509-544.
32. Gross, L.A., Baird, G.S., Hoffman, R.C., Baldrige, K.K. & Tsien, R.Y. (2000) The structure of the chromophore within DsRed, a red fluorescent protein from coral. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 97: 11990-11995.
33. Shaner, N.C., Campbell, R.E., Steinbach, P.A., Giepmans, B.N.G., Palmer, A.E. & Tsien, R.Y. (2004) Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp red fluorescent protein. *Nature Biotechnology*. 22: 1562-1572.
34. Shaner, N.C., Patterson, G.H. & Davidson, M.W. (2007) Advances in fluorescent protein technology. *J. Cell Sci.* 120: 4247-4260.
35. Shaner, N.C., Lin, M.Z., McKeown, M.R., Steinbach, P.A., Hazelwood, K.L., Davidson, M.W. & Tsien, R.Y. (2008) Improving the photostability of bright monomeric orange and red fluorescent proteins. *Nature Methods*. 5: 545-551.
36. Lacadena, J.R. (2003) Dichos, refranes y Genética. Lección Inaugural del Curso Académico 2003/2004, Universidad Complutense.
37. Lacadena, J.R. (2007) Conmemorando los 100 años del término "Genética" (1905-2005): Una historia "nobelada" de la Genética. Conferencia plenaria, Congreso de la Sociedad Española de Genética, Almería, 2005. Universidad de León.