



# Discovery and handling of Genes. Connections with Biology and Medicine

**Title in Spanish:** *Descubrimiento y manipulación de los genes. Conexión con la Biología y la Medicina*

M.<sup>a</sup> del Carmen Avendaño López<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Catedrática de Química Orgánica y Académica de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia.

**ABSTRACT:** This review analyses the advances of biological knowledge derived from the discovery and handling of genes, the connections between genetics and medicine and the perspectives of genomic editing.

**RESUMEN:** En esta revisión se analiza el avance que han experimentado los conocimientos biológicos como consecuencia del descubrimiento y manipulación de los genes, las interacciones de la genética y la medicina, y las perspectivas de la edición genómica.

\*Corresponding Author: [avendano@ucm.es](mailto:avendano@ucm.es)

Received: May 22, 2018 Accepted: May 23, 2018

An Real Acad Farm Vol. 84, N° 2 (2018), pp. 122-153

Language of Manuscript: Spanish

## 1. INTRODUCCIÓN

*Lo que impulsa a la ciencia es el intento de entender la naturaleza, y lo que impulsa a la tecnología, el intento de manipularla (1).*

Desde que a principio de los años setenta los biólogos empezaron a comprender cómo generan los genes la enorme complejidad de los seres vivos, tuvieron que afrontar también los efectos que produciría su inevitable manipulación. Cuando en 1971 los Institutos Nacionales de Salud de EEUU organizaron el congreso “**Perspectivas del cambio genético planeado**” para analizar las posibilidades de manipular genéticamente a los seres humanos, todos los participantes estuvieron de acuerdo en que su desarrollo solo era cuestión de tiempo.

A partir del año 2013, en que se supo que la **tecnología CRISPR/Cas9** permite de forma económica y sencilla reeditar los genes alterando las secuencias de ADN y modificar su función con toda precisión, la excitación y el miedo se han mezclado ante la perspectiva de que los humanos pueden por primera vez modificar o quizás eliminar por completo diversas poblaciones de organismos. Entre las potenciales aplicaciones de esta tecnología se incluye la corrección de defectos genéticos (eugenesia), el tratamiento y la prevención de la propagación de enfermedades, y la mejora de los cultivos agrícolas. Sin embargo, su utilización plantea serios interrogantes, porque **reescribir el código genético podría eliminar enfermedades pero también alterar el destino de las especies**. Este tema se ha comentado recientemente en una sesión de la RANF (2), pero creemos que podría ser de interés revisar algunos hitos del camino que se ha recorrido con anterioridad para descifrar la mecánica de los genes y cómo éstos pueden manipularse,

así como su impacto en la biología y la medicina.

Desde el principio de la historia de la humanidad fue evidente que los padres transmiten a sus hijos unos rasgos que a su vez ellos transmiten a sus hijos a lo largo de generaciones, pero el mecanismo de esta transmisión (la herencia) fue un gran misterio durante muchos siglos. Al conocimiento del gen como la unidad irreductible de la herencia y de la información biológica, transportador de cualquier rasgo que pueda heredarse total o parcialmente, se ha llegado en fechas relativamente recientes, y su manipulación sigue actualmente un progreso imparable.

## 2. EL CAMINO HACIA EL CONOCIMIENTO Y MANIPULACIÓN DE LOS GENES

### 2.1. El misterio de la herencia

En el siglo VI antes de Cristo, **Pitágoras** propuso una de las primeras y más extendidas teorías para explicar la herencia: el “**espermismo**”. Según ésta, la información hereditaria está contenida en el esperma del varón y se transmite al cuerpo de la mujer durante el coito para que ésta se encargue de la nutrición del nuevo ser. Esta teoría fue desmantelada por **Aristóteles** al observar que los hijos pueden heredar características de sus madres y abuelas, y que estas características pueden desaparecer en una generación y reaparecer en la siguiente. Para explicarlo, propuso que las hembras debían contribuir a la formación del feto aportando una especie de semen femenino: la sangre menstrual. Aristóteles concebía la herencia como una transmisión de información, aunque el papel de ambas aportaciones era diferente: la masculina se consideraba como “mensaje” y la femenina como “material”.

Los conocimientos científicos sobre la herencia apenas progresaron en los dos mil años siguientes y, a principios del siglo XVIII, varios biólogos seguían creyendo en la

teoría del “espermismo” (3). La idea de que la cabeza del espermatozoide contiene un “homúnculo”, un ser humano minúsculo a la espera de poder desarrollarse, surgió de la alquimia y se aplicó más tarde en la discusiones sobre la concepción y la herencia (Figura 1). Irónicamente, de existir este ser diminuto preformado, debería denominarse “femúnculo” porque el óvulo, además de proteínas y nutrientes, ribosomas y membranas, proporciona al embrión sus **mitocondrias**, unas estructuras subcelulares del citoplasma que sirven para producir energía. Éstas poseen un minigenoma de 37 genes, la seismilésima parte de los 21.000 a 23.000 genes presentes en los 23 pares de cromosomas que tienen las células humanas. Como su origen es exclusivamente femenino, los **genes mitocondriales** (que rara vez se combinan) están presentes como una sola copia, y sus mutaciones se transmiten intactas de mujer a mujer en las distintas generaciones. Cada mujer lleva en sus células genomas mitocondriales de sus futuros descendientes, un hecho que da cierto sentido a los términos “Eva, la madre bíblica” o “Lucy, la madre ancestral”.

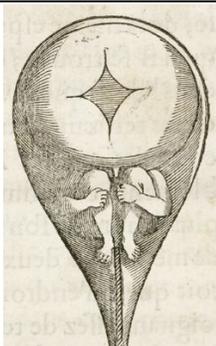


Figura 1. Representación de un “homúnculo”.

### 2.1. Darwin y Mendel. La evolución y la transmisión genética

Hacia la mitad del siglo XIX, los teólogos, astrólogos y estudiosos de la naturaleza, intimidados por el hecho de que si se apartaban del Génesis se apartaban de Dios, consideraban la cuestión del origen de las especies como “el misterio de los misterios”. Era menos problemático abordar la cuestión de cómo se genera la diversidad en la naturaleza, tarea que realizaron **Charles Darwin** a través de la observación y **Gregor Mendel** a través de la experimentación (Figura 2).

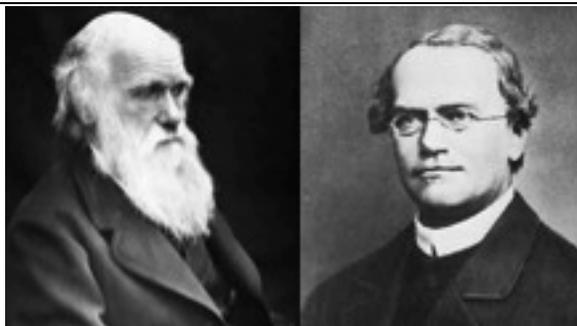


Figura 2. Charles Darwin y Gregor Mendel.

Durante su viaje de cinco años en el *Beagle*, Darwin se preocupó fundamentalmente del fenómeno de la **variación natural** o **evolución espontánea**: ¿cómo producen los animales en ocasiones descendientes con rasgos diferentes a los de sus progenitores y tiene lugar la **especiación**?. En la naturaleza tenía que ser posible la producción de variantes y la transmisión de estas variaciones, por lo que **la herencia tenía que ser estable y a la vez mudable**. Cuando en 1859, tras largos años de reflexión, Darwin publicó “**El origen de las especies por medio de la selección natural**”, toda su teoría requería apoyarse en conocimientos básicos acerca de la herencia que todavía no se habían desarrollado. Lleno de dudas, propuso la **teoría de la “pangénesis”** (génesis de todo), imaginando que las células de todos los organismos producen partículas diminutas, las “**gémulas**”, que contienen la información hereditaria y circulan por los animales y plantas hasta que pasan su información a las células germinales cuando llegan a la madurez. Las gémulas secretadas por cada órgano llevan las instrucciones para generar un órgano similar y, al formarse un embrión, las instrucciones de los progenitores se mezclan como los colores en una pintura. **Jenkin**, uno de los críticos de Darwin, argumentaba que si la herencia no tiene **recursos para mantener una variación y fijar un carácter alterado**, esta variación se desvanecería con el paso del tiempo, diluyéndose en la mezcla de pinturas hasta desaparecer.

Parece que Darwin no conoció, o no le interesó, un artículo sobre híbridos de guisantes titulado “**Experimentos de hibridación en plantas**”. Este trabajo se publicó en 1866 en *Anales de la Sociedad de Ciencias Naturales de Brno*, una revista que apenas se leía en el mundo científico. Su autor fue el modesto monje agustino Gregor **Mendel**, un pionero que tras más de ocho años de trabajo **proporcionó los conocimientos básicos de la herencia y fundó la biología moderna** a través de su aparentemente sencilla experimentación realizada en la abadía de Brno, hoy perteneciente a la República Checa. Los experimentos de Mendel pusieron de manifiesto que la herencia solo puede explicarse por la transmisión de los progenitores a su progenie de **unidades discretas de información** que se comportan como entidades independientes. Por ejemplo, el color de la flor del guisante no tiene ningún vínculo con la altura del tallo o el aspecto de las semillas. Según Mendel, cada característica se hereda de forma independiente, siendo posibles todas las combinaciones de rasgos.

A pesar de su transcendencia, los descubrimientos de Mendel permanecieron olvidados casi 40 años, y solo empezaron a interesar a los científicos a finales del siglo XIX. Uno de sus seguidores fue el biólogo inglés **William Bateson**, que acuñó en el año 1905 el término “**genética**” para designar el estudio de la herencia. Otro firme defensor de Mendel fue el botánico danés **Wilhelm Johannsen**, que en 1909 acuñó el término “**gen**” como abreviatura de la palabra *pangen* previamente propuesta por el holandés **Hugo de Vries** en 1889. Los experimentos de Johannsen

apoyaron la teoría de este último acerca de que **la mutación se produce a través de cambios repentinos y específicos de las unidades de la herencia en las células germinales.**

Cien años después de las observaciones de Darwin, **Theodosius Dobzhansky** (un biólogo ucraniano emigrado a Estados Unidos) estudió la variación genética en poblaciones salvajes, demostrando que ninguna variante es superior a las demás y que la variación genética es la norma en la naturaleza. Sin una profunda diversidad, un organismo puede terminar perdiendo su capacidad para evolucionar. En su labor como **crítico de la eugenesia** señaló que la selección de los mejores en función de sus fenotipos es un método defectuoso para garantizar una genética óptima porque **los fenotipos no solo están determinados por los genes, sino también por el medio ambiente y el azar.** El año 1973 aseguraba que **nada tiene sentido en biología si no es a la luz de la evolución:** *“Creation is not an event that happened in 4004 BC. It is a process that began some 10 billion years ago and is still under way”* (4). En este periodo se reavivó la controversia entre la teoría de la evolución y la fe religiosa, destacando el filósofo creacionista **Pierre Teilhard de Chardin**, que consideró que la creación se realiza de forma continuada por medio de la evolución.

En la actualidad, muchos científicos consideran que **la teoría de la evolución natural de las especies** se puede aplicar a la oncología. De acuerdo con las ideas darwinianas, la intervención terapéutica puede diezmar a las células cancerosas, pero al mismo tiempo ejerce una presión que favorece las **variaciones clonales que hacen a estas células resistente al tratamiento** (5). El complejo ecosistema humano permite que un tumor crezca, mute y atraviese etapas en las que se altera y responde a su entorno con el objeto de sobrevivir.

### 2.3. Eugenesia e higiene racial

Entre los científicos que se opusieron a la teoría mendeliana de los genes se encontraba **Francis Galton**, un prolífico autor que apoyado en las ideas de su primo Charles Darwin se dedicó al estudio del ser humano y de las diferencias individuales. Galton acuñó en sus últimos años el término **“eugenesia”** para denominar a la ciencia dedicada al estudio de la mejora de la raza humana a través de la reproducción selectiva de los individuos que poseen los mejores rasgos (6). Estas ideas se convertirían poco después en la base de la **“higiene racial”** propuesta por la doctrina nazi, que utilizó la esterilización, el confinamiento y el exterminio de los seres que a su entender poseían genes defectuosos. En los Estados Unidos la discriminación de los ciudadanos negros comenzó mucho antes, y en los años 1920 se aprobaba la esterilización forzada de mujeres consideradas como imbeciles (Figura 3).

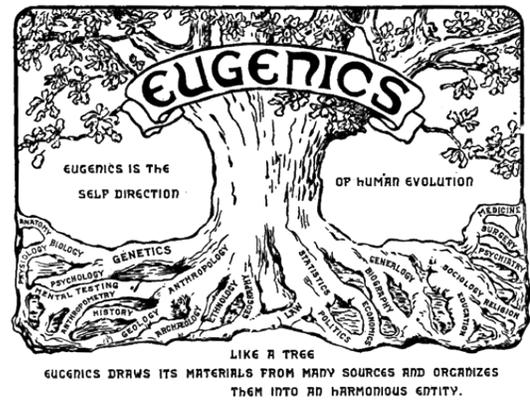


Figura 3. Representación del árbol eugenésico.

En el mismo periodo, los **científicos de la Unión Soviética** plantearon que los genes eran un espejismo creado por la burguesía para fijar las diferencias individuales, y propusieron que la limpieza que necesitaba el Estado se lograría a través de la reeducación de los individuos. Por extensión, el investigador agrícola **Lysenko** propugnó que la hambruna podía combatirse “reeducando” a las plantas alimenticias para que crecieran en cualquier clima. Los argumentos para defender la **preponderancia de unas razas sobre otras** se aplican hoy como base de algunos nacionalismos, y el nexo entre el crimen y ciertos genes se ha debatido y se sigue debatiendo en múltiples países.

### 2.4. Los cromosomas: descubrimiento del cromosoma Y y del gen de la masculinidad

Para entender como funcionan los genes tenía que descubrirse primero en qué lugar de las células se encuentran, ya que a lo largo del siglo XIX solo eran “visibles” en un sentido estadístico. **Theodor Boveri**, un embriólogo alemán que trabajaba con erizos de mar en la década de 1890, propuso que los genes se encontraban en unas estructuras filiformes enrolladas en el núcleo de las células que se denominaron **“cromosomas”** porque podían teñirse de azul con anilina. Esta hipótesis fue corroborada en 1906 por **Nettie Maria Stevens**, quien demostró que los genes que determinan el sexo en los gusanos de la harina se encontraban en cromosomas que podían distinguirse al microscopio. Por analogía, aunque no se supiera cómo se organizaban, todos los genes deberían estar situados en los distintos cromosomas.

Cuando se observaban al microscopio las células de los gusanos hembra de la harina se veían 10 pares de cromosomas “homólogos”, mientras que en las de los gusanos macho había un par de cromosomas dispares. Uno de éstos, al que se denominó posteriormente **“cromosoma Y”** (el masculino), se veía como una pequeña mancha de forma nudosa mientras que su pareja era un cromosoma más grande que se denominó posteriormente **“cromosoma X”** (el femenino). Entonces pudo razonarse en lenguaje cromosómico que las células masculinas serían XY y las femeninas XX. El óvulo contendría un único cromosoma X mientras que el espermatozoide puede ser portador del cromosoma Y, resultando la combinación XY la que

determina el sexo masculino, mientras que si es portador del cromosoma X resulta la combinación XX que determina el sexo femenino. La **determinación del sexo es un proceso aleatorio** regido por la naturaleza genética X o Y del primer espermatozoide que alcanza y fecunda el óvulo (Figura 4).

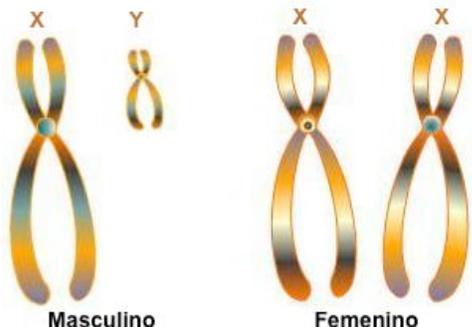


Figura 4. Cromosomas sexuales.

Hacia el año 400 a. C., el filósofo presocrático **Anaxágoras** pensaba también que la determinación del sexo era un proceso aleatorio, pero creía que dependía del lugar de producción y de destino del espermatozoide: el producido en el testículo derecho se dirigiría al lado derecho del útero donde se formaría un feto masculino, mientras que el del izquierdo lo haría al lado izquierdo donde se formaría un feto femenino. Estas ideas, que hoy parecen tan absurdas, se debían al gran desconocimiento que se tuvo durante miles de años de las diferencias anatómicas entre hombres y mujeres. **Galeno** en el siglo II, y sus seguidores durante la Edad Media, consideraron que el útero era un escroto alojado en el interior de la mujer y las trompas de Falopio eran vesículas geminales más grandes que las del varón.

Tras descubrirse el **cromosoma Y** sorprendió su pequeño tamaño. Hoy se supone que, a fin de preservar a lo largo de millones de años los genes que albergan la información que determina la masculinidad, este cromosoma ha ido perdiendo otros genes porque al carecer de pareja o copia que lo duplique no podrían repararse los genes que contiene si éstos se alteran. Algunos consideran que la reducción de tamaño del cromosoma Y no ha acabado (recordemos que **la evolución está ligada a la pérdida de genes o de su función**) (7). El por qué de la reproducción sexual, siendo la asexual un proceso más simple y eficiente, sigue siendo intrigante, y muchos evolucionistas opinan que el sexo no se creó para la reproducción sino para permitir la recombinación genética y lograr una mayor variación entre las especies.

Una vez descubierto que el alojamiento de los genes que determinan el sexo masculino era el cromosoma Y, quedaba por conocer cuáles eran estos genes. El problema se resolvió gracias al hallazgo en 1955 del **síndrome de Swyer**, nombre de un endocrinólogo inglés que estudiaba la infertilidad humana. Las mujeres infértiles que mostraban este síndrome eran anatómicamente y fisiológicamente femeninas durante su infancia, pero no alcanzaban la madurez sexual femenina al comienzo de su edad adulta. Cuando los genetistas estudiaron sus células

descubrieron que todas ellas tenían cromosomas XY, por lo que nacían con el patrón cromosómico masculino, pero en un momento dado de la gestación se debía producir una mutación que inactivaba al gen que especifica la masculinidad. En los años 1980, el genetista británico **Peter Goodfellow** estudió a estas mujeres y encontró que, en efecto, **un gen situado en el cromosoma Y estaba mutado e inactivado** por lo que los individuos eran anatómicamente y fisiológicamente femeninos. Estos genes, que se denominaron **genes SRY (sex-determining region Y)**, son pequeños y sin intrones (ver el apartado 2.9) y codifican una proteína que se expresa preferentemente en los testículos. Cuando Goodfellow insertó una copia extra de este gen en hembras de ratones, sus crías nacieron con el cromosoma XX en todas sus células pero eran machos anatómicamente y en su comportamiento (se había producido el síndrome de Swyer al revés) (8). El gen **SRY** controla la determinación del **sexo**, entendido éste como la suma de aspectos anatómicos y fisiológicos de los cuerpos masculino y femenino. Si **SRY** está “conectado” un animal será anatómicamente y fisiológicamente macho, pero si se “desconecta” se volverá anatómicamente y fisiológicamente hembra.

Los determinantes genéticos de la conducta y las preferencias sexuales fueron un misterio para **Darwin**, quien dedicó a este asunto gran parte de su libro publicado en 1871 “El origen del hombre. La selección natural y la sexual”. Si se admite que el sexo es algo diferente al **género** (las actitudes psíquicas, sociales y culturales que asume una persona) o a la **identidad de género** (el sentimiento que se tiene de sí mismo), podemos preguntarnos si estas cuestiones también están gobernadas por los genes. Dentro de la controversia general sobre **lo innato y lo adquirido**, la teoría dominante en la sociedad hasta finales de los años ochenta fue que la homosexualidad era adquirida, no innata. Sin embargo, hoy parece estar claro que los genes son mucho más influyentes que cualquier otra circunstancia, y muchos consideran que para definir el género o la identidad de género, el gen **SRY** u otros posibles genes todavía desconocidos deben actuar, activando unos genes y reprimiendo otros, complementados con otros muchos factores ambientales. Algunos estudios han validado el nexo entre la homosexualidad y un gen próximo al **fragmento Xq28** situado en el cromosoma X (9), pero todavía no se ha aislado un gen que influya realmente en la identidad sexual.

#### 2.5. Vinculación de los genes e intercambio genético.

En 1905 el genetista **Thomas Hunt Morgan**, trabajando en la Universidad de Columbia, comenzó a estudiar el desarrollo embrionario de la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*) aplicando a los animales los estudios que Mendel había realizado con plantas (figura 5). Se trataba de **identificar las mutaciones de rasgos visibles que pudieran seguirse a lo largo de generaciones**. Sus estudios convirtieron a esta mosca en uno de los principales organismos modelo utilizados en genética y dieron lugar a varios Premios Nobel incluyendo

el otorgado a Morgan en 1933.



Figura 5. *Drosophila melanogaster*.

Morgan y sus discípulos descubrieron en 1910 que había aparecido de forma espontánea entre las moscas de estirpe silvestre de ojos rojos un mutante de ojos blancos. El gen mutado responsable de este cambio en el color de los ojos se denominó “**gen white**”, un calificativo que fue la causa de que a partir de entonces comenzaran a nombrarse los genes según el fenotipo que producían sus alelos mutantes. Un fenotipo es el conjunto de características de orden físico o biológico que distingue a un organismo mientras que un genotipo es su composición genética. Un alelo es una variante de un gen generalmente causada por mutaciones. Un gen puede tener múltiples alelos que se diferencian en su secuencia y pueden manifestarse en modificaciones concretas de la función de ese gen.

El rasgo “ojos blancos” solo aparecía en los machos, luego estaba sistemáticamente ligado al sexo y el gen responsable de su aparición residía en el cromosoma Y, pero al tener el *gen white* un carácter recesivo, cuando un macho de ojos blancos se cruzaba con una hembra de ojos rojos su progenie tenía ojos rojos. Se había descubierto que los **genes no siempre se comportan de forma independiente**. Hoy sabemos que la vinculación de un determinado gen al sexo no solo se da en las moscas de la fruta, sino también en las personas. En éstas es notable el caso de la **hemofilia**, una enfermedad de la sangre potencialmente letal provocada por una mutación que causa la ausencia o disminución de proteínas esenciales para la coagulación (factores VIII o IX). Las mujeres pueden transportar el gen de la hemofilia, pero solo los varones pueden resultar afectados por la enfermedad.

El grupo de Morgan observó que también estaban vinculados entre sí otros genes. Por ejemplo, el gen de ojos color azabache en las moscas casi nunca se heredaba independientemente del gen de las alas pequeñas, por lo que ambos deberían residir en el mismo cromosoma. En general, la herencia de rasgos inseparables se debía a que los genes responsables estaban situados en un mismo cromosoma (10). Si dos genes tendían a ser coheredados deberían encontrarse en el mismo cromosoma, mientras que si no estaban vinculados deberían estar localizados en cromosomas distintos. Sin embargo, en algunas ocasiones se observaba que un gen de un cromosoma paterno se desvinculaba de sus compañeros en un embrión y pasaba a uno materno, produciendo un individuo “raro”. Esto significaba que, además de la transmisión vertical de los genes, **el material genético puede transmitirse**

**horizontalmente** (Morgan calificó este fenómeno como “**intercambio genético**” o “**transformación**”). Quedaba establecido que la información genética puede intercambiarse entre cromosomas de un organismo, entre organismos y entre especies, y aunque se produce raramente en mamíferos, es frecuente entre bacterias (recordemos que los genes de resistencia a antibióticos son intercambiables habitualmente entre ellas) (11).

El bacteriólogo inglés **Frederick Griffith** demostró en 1928 que en la “transformación” los genes pueden ser transportados por simple contacto, al margen de cualquier forma de reproducción (12). Griffith utilizó dos cepas de la bacteria *Streptococcus pneumoniae*, causante de la neumonía neumocócica, que podían distinguirse porque una tenía una capa lisa formada por azúcar (y por eso escapaba del sistema inmunitario por lo que era muy virulenta) mientras que la otra era áspera, carecía de la capa de azúcar y era vulnerable al ataque inmunológico. Cuando mezcló la cepa de bacterias lisas (virulentas), muertas previamente por el calor, con bacterias vivas de la cepa arrugada, estas últimas adquirieron la capa lisa y se convirtieron en virulentas. El fenómeno se había producido químicamente, ya que el gen que determina la virulencia había pasado de la sopa química formada por los restos de las bacterias muertas a las vivas. Por su parte **Muller** (otro antiguo alumno de Morgan), había descubierto en 1926 que las mutaciones podían inducirse en una población de moscas exponiéndolas a rayos X de intensidad baja, es decir, suministrando energía (13). Así pues, **las alteraciones genéticas podían inducirse artificialmente, y la biología empezaba a convertirse en química**.

#### 2.6. Componentes químicos de los genes: Estructura del ADN

Los genetistas habían empezado a visualizar los genes contenidos en los cromosomas, pero ¿qué componentes químicos constituían los genes? El experimento de Griffith dio paso a muchas especulaciones sobre la identidad molecular de los genes. Ésta se buscaba triturando células y analizando sus componentes químicos. Se sabía que los genes se encontraban en la **cromatina** del núcleo y que ésta estaba formada por proteínas y ácidos nucleicos. Las proteínas y sus funciones eran entonces bastante conocidas, mientras que los ácidos nucleicos eran muy desconocidos. Por ello, se pensó en principio que los genes estaban compuestos de proteínas.

Los ácidos nucleicos se habían descubierto en 1869 por el bioquímico suizo **Friedrich Miescher** en materiales procedentes de los núcleos de ciertas células humanas y animales. Eran hebras blanquecinas que poseían carácter ácido, de ahí su nombre. A principios de la década de 1920 se sabía que existían dos modalidades, el ADN y el ARN, y que ambos estaban formados por bases unidas entre sí a lo largo de una cadena. Las bases presentes en el ADN eran adenina (A), guanina (G), citosina (C) y timina (T), mientras que en el ARN había uracilo (U) en vez de timina. Eran compuestos demasiado simples para ser los agentes activos de la herencia, aunque sí podrían ser el hilo del collar que sujeta a las perlas, que serían las proteínas.

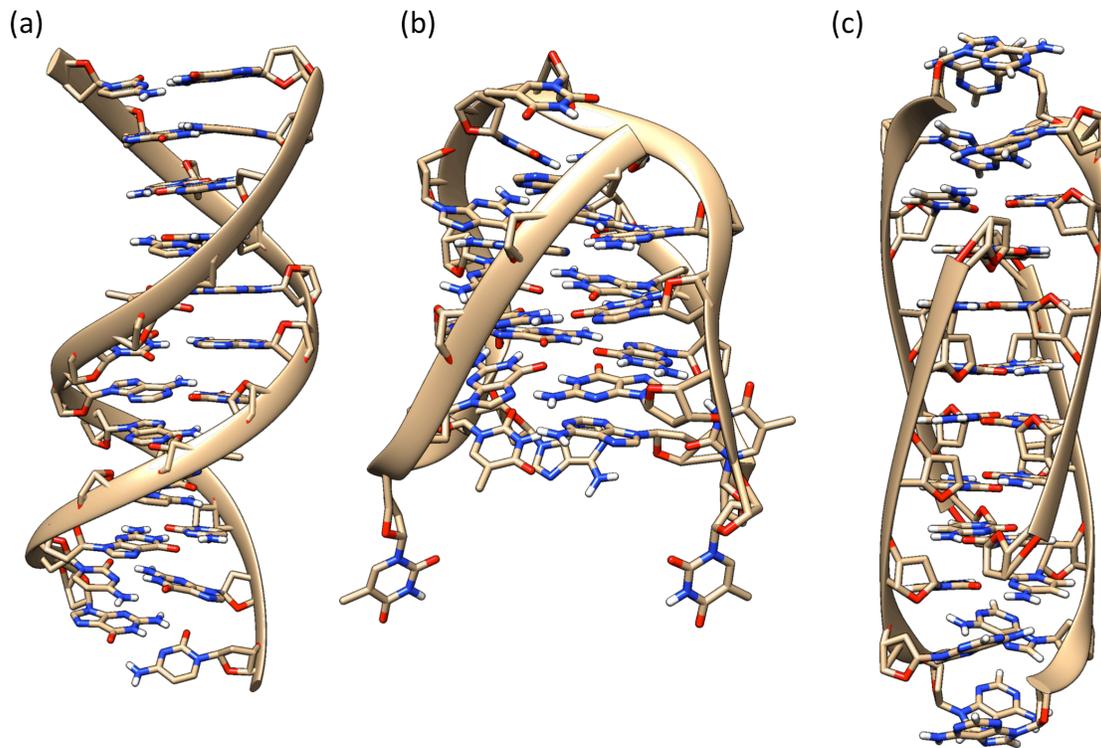
En 1933 **Oswald Avery**, un profesor de la Universidad Rockefeller experto en neumococos, conoció el experimento de transformación de Griffith y decidió repetirlo, porque no creía que unos desechos químicos pudieran transportar información genética a una célula. Al comprobar que el fenómeno se repetía, desarrolló diversos cultivos hasta que logró un detritus bacteriano muy concentrado. Tras separar sus componentes con distintos tratamientos, examinó la capacidad de cada porción para transmitir la información genética, observando exclusivamente la “transformación” en la fracción formada por ácidos nucleicos. Puesto que con la adición de una enzima que digería el ARN no desaparecía la actividad, ésta se debía al ADN. La publicación de éste y otros experimentos confirmativos se produjo en 1944 (14), aunque muchos eminentes científicos tardaron años en aceptar que el ADN pudiera contener la información genética. De hecho, a Avery se le negó el Premio Nobel de Fisiología o Medicina a pesar de que obtuvo tres nominaciones para el mismo.

El conocimiento de la estructura del ADN tuvo lugar en 1953, cuando **James Watson** y **Francis Crick**, apoyados en los trabajos que realizó **Rosalind Franklin** utilizando la cristalografía de rayos X para fotografiar al ADN en el King's College de Londres, resolvieron su estructura de doble hélice estabilizada por enlaces de hidrógeno entre las 4 bases púricas (A y G) y pirimidínicas (T y C) (15). La historia es bien conocida y podemos resumirla empezando por la llegada a Cambridge del físico neozelandés **Maurice Wilkins**, quien decidió estudiar por difracción de rayos X la estructura del ADN. Esta técnica, junto con un uso inteligente de modelos moleculares, había sido utilizada en el Caltech por los químicos físicos **Linus Pauling** y **Robert Corey** para determinar la estructura de varios fragmentos de proteínas y descubrir que éstas se pliegan con frecuencia formando una sola hélice. Al proyecto de Wilkins se incorporó como cristalógrafa en 1950 Rosalind Franklin, mientras que Watson y Crick lo hicieron en 1951. Pauling y Corey trataban también de resolver la estructura del ADN con una metodología semejante, por lo que la competencia era enorme.

Aunque los datos de rayos X que originaban los cristales de ADN eran compatibles con una estructura de dos, tres, o cuatro cadenas, cuando Watson y Crick observaron la mejor fotografía obtenida por Franklin, la

“fotografía 51”, se dieron cuenta de su sencillez y empezaron a elaborar diversos modelos que contenían dos cadenas helicoidales entrelazadas. Se basaron también en las mediciones que Franklin había reflejado en un informe previo que, aunque no era expresamente “Confidencial”, era obvio por su importancia que no debía manejarse libremente. Fueron también de gran ayuda para determinar la disposición y apareamiento de las bases los trabajos del bioquímico **Erwing Chargaff**, quien encontró en 1950 que al descomponer el ADN, las bases A y T, al igual que G y C, siempre estaban presentes en una proporción casi idéntica. Además, los modelos moleculares corroboraron que el par A...T tenía una forma idéntica al par G...C, de forma que los pares de bases podían apilarse hacia el centro de la hélice.

Aunque la estructura de doble hélice del ADN es general, se conocen otras estructuras que están presentes de forma minoritaria. En las células eucariotas los extremos de los cromosomas están marcados por los “**telómeros**”, que son secuencias de ADN no codificantes cuya función principal está relacionada con la estabilidad estructural de los cromosomas, la división celular, y el tiempo de vida de las estirpes celulares. Un ADN telomérico humano puede formar una doble hélice clásica, pero también, una hebra rica en G puede adoptar por separado una conformación de cuatro pisos (“**quadruplex**”), cada uno de los cuales es un plano formado por cuartetos de guanina (Figura 6) (16). Si una hebra de ADN es rica en citosina puede plegarse también como un **motivo intercalado** (*i-motif*), un nudo en el que algunas citosinas en vez de unirse por enlaces de hidrógeno a guaninas se enlazan a otras citosinas que se encuentran en forma protonada (17). Las secuencias que originan G-quadruplex están relacionadas con la actividad transcripcional de genes relacionados con el cáncer (como *c-Myc*, *k-Ras*, *PDGF*, etc.) y, por esta razón, algunos de sus ligandos inducen la apoptosis de células cancerosas. Por otra parte, los *i-motifs* se forman, disuelven y se vuelven a formar en las fases G1 tardías (cuando el ADN se “lee” con más intensidad para ser copiado) y pueden aparecer en las regiones promotoras y en los telómeros. Por ello, se piensa que pueden tener importancia como reguladores del funcionamiento celular. Varios biólogos australianos han observado recientemente *i-motifs* en células humanas vivas (18).



**Figura 6.** ADN de doble hélice (pdb 6cq3), quadruplex (pdb 143d), e *i-motif* (pdb 1ybl). Las tres estructuras se han representado con el programa Chimera 1.10.

Watson, Crick y Wilkins recibieron el Premio Nobel de Fisiología y Medicina de 1962. Su modelo de ADN marcó el final de una concepción del gen como un portador y transmisor misterioso de mensajes a lo largo de generaciones y el comienzo de los trabajos para descifrar su código. En química, la estructura de una molécula está íntimamente ligada a su función. ¿Cómo podían cuatro bases de una cadena molecular determinar el color de los ojos o la propensión a padecer una enfermedad?

### 2.7. El código genético

El eslabón perdido entre los genes y los rasgos físicos empezó a desvelarse en 1941, cuando **George W. Beadle** (otro alumno de Morgan) y **Edwards L. Tatum** demostraron cómo **los genes dirigen la síntesis de enzimas que controlan procesos metabólicos**. En 1937 decidieron experimentar con *Neurospora crassa*, un moho del pan todavía más simple que la mosca de la fruta que es capaz de crecer en caldos de cultivo que solo contienen un azúcar y biotina. Las células de este moho deberían poseer una maquinaria enzimática capaz de sintetizar macromoléculas complejas con estos simples compuestos por lo que, si se producía un mutante del moho en el que una de estas enzimas estuviera inactivada, su función metabólica desaparecería y sería necesaria la adición al medio de cultivo del ingrediente ausente para la supervivencia del moho. Al observar que cada mutante perdía una sola función metabólica que correspondía a la actividad de una sola enzima, dedujeron que **un gen actúa codificando información para construir una proteína y ésta posibilita una función** (19). Estos hallazgos les

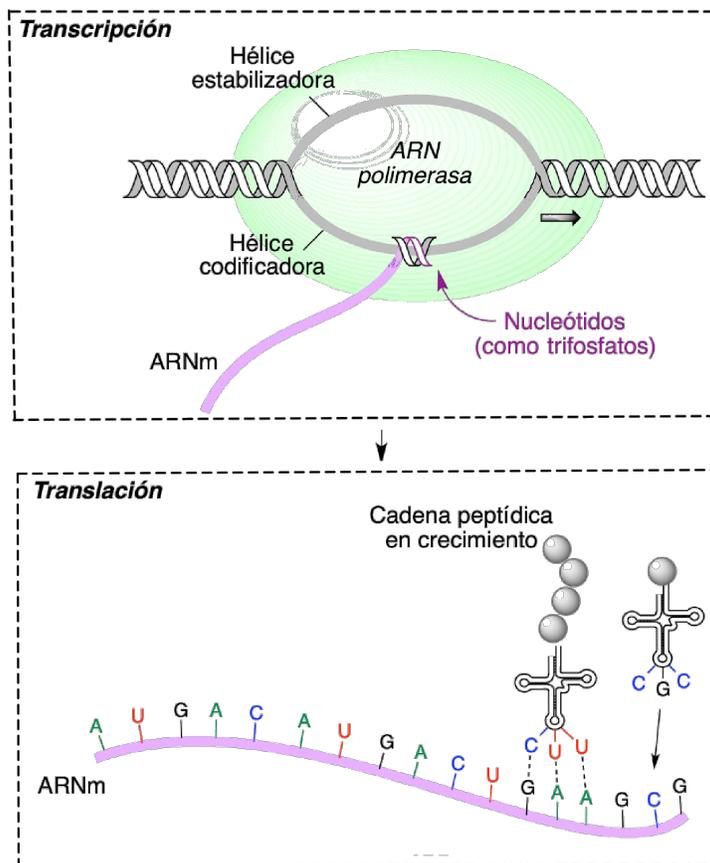
valieron para recibir el Premio Nobel en 1958, pero sus estudios dejaban sin resolver una gran pregunta: ¿Cómo genera una secuencia de ADN (ATCCCG.....) las instrucciones para construir una proteína?

A mediados de los años 1950 algunos investigadores, entre otros **Watson**, **George Gamow**, y **Walter Gilbert** en Harvard, **Sydney Brenner** en Cambridge, y **Jacques Monod** (otro discípulo de Morgan) y **François Jacob** en París, sospechaban que el ADN creaba primero una molécula mensajera (intermedia), que debería ser un ARN puesto que tendría que desplazarse desde el núcleo al citoplasma. Los expertos sabían que las proteínas se sintetizaban en componentes celulares especializados llamados **ribosomas**, pero cuando éstos intentaban aislarlos se descomponían. Tras descubrirse que el ión magnesio era necesario para estabilizarlos, se pudo aislar una pequeña cantidad de moléculas mensajeras procedentes de células bacterianas que se identificaron como **ARN mensajero**. Los resultados se publicaron en 1960 en dos trabajos consecutivos de la revista *Nature* (20). En la generación de una copia de un gen en el ARN se reescribe una “palabra” en un lenguaje que sólo se diferencia del original en la sustitución de la letra T por U, por ello se denominó “**transcripción**”. El problema ahora era resolver cómo se realizaba la descodificación (o “**traducción**”).

Puesto que las proteínas se construyen con 20 aminoácidos, cuatro letras no pueden determinar por sí solas 20 alternativas. **Watson** y **Crick** supusieron desde un principio que la información genética se encierra en

secuencias precisas de bases (21). **Crick** y **Brenner**, basándose en ingeniosos experimentos y en una aritmética elemental, propusieron que cada aminoácido de una proteína tendría que estar especificado por tres bases. Un **código triplete** permitía 64 combinaciones, suficientes para especificar los 20 aminoácidos y otras funciones (como las de empezar o parar la síntesis de una cadena de proteína). Si el código estuviera especificado por 2 bases, solo se podrían obtener 16 combinaciones (insuficientes para 20 aminoácidos) y si fueran 4 bases habría 256

permutaciones (muchas más de las necesarias). En 1965, numerosos estudios habían logrado **asignar correctamente cada triplete de ADN a un aminoácido diferente**. También se sabía que el triplete ATG era el código para iniciar la síntesis de una proteína y que los tripletes TAA, TAG y TGA eran códigos para detenerla (figura 7).



**Figura 7. Transcripción y traducción.**

La información genética está contenida en la propia molécula de ADN. El código o la clave radica en el orden en que se presentan las cuatro bases: adenina, citosina, guanina y timina. El cambio de una sola base de un triplete que codifique un aminoácido importante para la función de una proteína puede originar graves problemas, como es el **caso de la anemia falciforme**. En los enfermos que la padecen, un triplete GAG en el ADN del gen que codifica la cadena B de la hemoglobina cambia a GTG, lo que implica la sustitución de un residuo de glutamato por uno de valina que altera el plegamiento normal de la hemoglobina y su función transportadora de oxígeno.

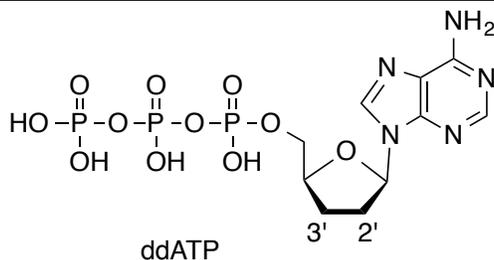
Para reconocer el sitio donde tiene que comenzar la transcripción existen proteínas reguladoras denominadas “**factores de transcripción**” que se unen a secuencias específicas de ADN llamadas **promotores**. La

transcripción del ADN al ARN es universal en los seres vivos, aunque en los retrovirus se produce a la inversa, del ARN a ADN. Hay que señalar que el ARN no es solo un mensajero imprescindible en la transcripción genética, sino que tiene otras muchas funciones (22-24).

### 2.8. Secuenciación de genes

En 1962, el bioquímico **Frederick Sanger**, que había recibido el Premio Nobel en 1958 por haber determinado cual es la secuencia de aminoácidos de la insulina y otras muchas proteínas mediante reacciones sucesivas de degradación, empezó a pensar en cómo se podía identificar la secuencia de mononucleótidos en un gen. Sin embargo, cuando intentaba utilizar la degradación del ADN para este propósito, sólo obtenía una mezcla indescifrable. En 1971 pensó que sería más útil trabajar al revés: construyendo el ADN en vez de degradarlo. Su técnica consistía en **utilizar**

**la reacción de la polimerasa en la copia del ADN** (ver el apartado 2.13), pero esta enzima actuaba a gran velocidad añadiendo nucleótidos a la copia sin que se pudiesen determinar cuáles eran las bases que se iban añadiendo (-A,C,C,C,T,G,C, etc.). En 1977, Sanger desarrolló un método para parar la reacción utilizando pequeñas cantidades de 2',3'-didesoxinucleótido trifosfatos (ddNTPs) (ver un ejemplo en la Figura 8). Éstos impiden la elongación de cadena catalizada por la ADN polimerasa porque, aunque pueden insertarse en una hebra de ADN, la carencia del grupo 3'-hidroxilo no permite que se formen enlaces fosfato con un nuevo 2'-desoxiribonucleósido trifosfato.



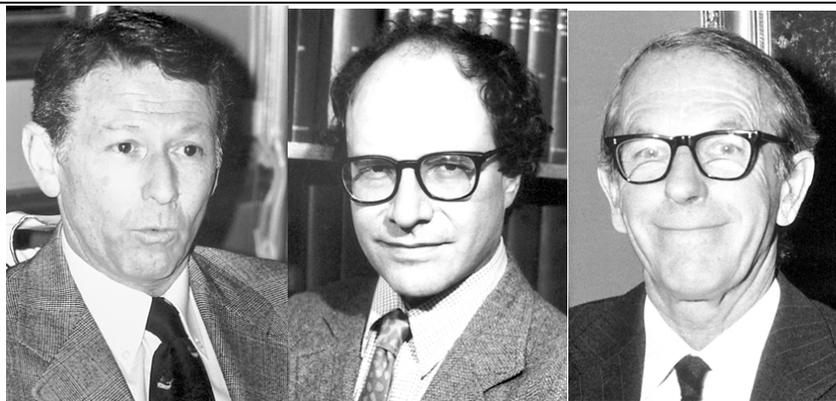
**Figura 8.** Los ddATPs carecen del grupo hidroxilo en 3' de los 2'-desoxiribonucleótidos.

La reacción en cadena de la polimerasa con una muestra de ADN en una mezcla que contenga un cebador, los cuatro 2'-desoxiribonucleótidos, y un 2',3'-didesoxiribonucleótido, producirá cadenas cuya longitud dependerá de donde se encuentre el nucleótido con una base complementaria a la del 2',3'-didesoxiribonucleótido utilizado, porque su incorporación finalizará la reacción en cadena. La secuenciación se lleva a cabo en cuatro tubos, cada uno con un ddNTP distinto. Cuando la ADN polimerasa incorpora aleatoriamente un ddNTP la reacción se detiene, de manera que se generan fragmentos de distinta longitud, todos ellos con el mismo ddNTP

terminal. Los diversos fragmentos se separan en función de su tamaño mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (una técnica que permite separar fragmentos de ADN cuya longitud difiere en un sólo nucleótido). A partir del gel se puede reconstruir la secuencia que se ha sintetizado, que es complementaria a la secuencia del molde (25). Mediante esta tecnología, se puede determinar la secuencia de moléculas de ADN de hasta 800 nucleótidos de longitud y fue utilizada por primera vez por Sanger para resolver la secuencia completa del **bacteriófago ΦX174** en 1977 (26).

En 1976-1977, **Allan Maxam** y **Walter Gilbert** desarrollaron un método diferente para secuenciar ADN basado en su modificación química y posterior escisión donde se encuentren bases específicas (27). El método requiere el marcaje radioactivo en uno de los extremos y la purificación del fragmento que se desea secuenciar. Tras un adecuado tratamiento químico se obtienen fragmentos de ADN de diferente longitud cuyas secuencias de nucleótidos se identifican por electroforesis en gel. Para visualizar los fragmentos generados en cada reacción se hace una autoradiografía que proporciona una imagen de bandas oscuras correspondientes a los fragmentos marcados con el radioisótopo y, a partir de ellos, se puede deducir la secuencia. Por ser bastante laborioso este procedimiento se ha sustituido por métodos enzimáticos como el de Sanger que, además de ser más sencillos, pueden llevarse a cabo de forma automatizada.

El año 1980, **Sanger** y **Gilbert** compartieron la mitad del Premio Nobel de Química "for their contributions concerning the determination of base sequences in nucleic acids". **Paul Berg** recibió la otra mitad "for his fundamental studies of the biochemistry of nucleic acids, with particular regard to recombinant-DNA" (ver el apartado 2.11) (Figura 9).



**Figura 9.** Paul Berg, Walter Gilbert y Frederick Sanger.

### 2.9. ADN complementario o ADN copia (ADNc). Transcriptasa inversa

En 1970 los virólogos **David Baltimore** y **Howard Temin**, trabajando de forma independiente, descubrieron en los retrovirus una enzima que contradecía el dogma central de Crick: "la información genética solo transita de

los genes a los mensajes y nunca al revés". Esta enzima podía construir ADN a partir de una plantilla de ARN, por lo que la llamaron **transcriptasa inversa** o **retrotranscriptasa**. Pronto demostró su utilidad en el proceso de **clonación de genes**. Las técnicas de secuenciación de genes habían permitido descubrir que

mientras que los genes bacterianos no contienen módulos separados ni están divididos por espaciadores, los de los virus y animales suelen estar divididos en módulos denominados “**exones**” interrumpidos por largos tramos de ADN denominados “**intrones**” que carecen de información para codificar una proteína. Estas divisiones permiten a las células generar múltiples mensajes a partir de un único gen variando el modo de empalmar los módulos, dando lugar a distintas “**isoformas**”.

El **ADN complementario (ADNc)** es un ADN de doble cadena que, debido a la naturaleza de su síntesis, carece de intrones. Se sintetiza a partir de una hebra simple de ARNm maduro y se suele utilizar para la clonación de genes propios de células eucariotas en células procariotas. El ARNm eucariótico y el procariótico también se diferencian en que el primero puede contener intrones mientras que el segundo no los tiene, por lo que las células procarióticas carecen del mecanismo para eliminar los intrones siguiendo el proceso de **corte y empalme (splicing de ARN)** que utilizan las células eucariotas. En éstas, los ARNs transcritos se modifican a través de un proceso de maduración que, tras cortes y empalmes, elimina ciertos intrones para producir el ARNm final. Si se quieren expresar genes eucariotas en células procariotas para su clonación, y se inserta en éstas el ADN eucariótico para que se transcriba en ARNm, el proceso no puede

completarse por la carencia mencionada. Además, como en los genes humanos los intrones son a menudo enormes y ocupan grandes tramos de ADN, resultan demasiado largos para caber en un plásmido bacteriano. En definitiva, **si se quiere expresar un gen eucariótico en un sistema procariótico se deberá clonar a partir de su ADNc** y no de su secuencia genómica, porque probablemente ésta estará interrumpida por intrones.

La transcriptasa inversa resolvió estos problemas al permitir construir genes a partir de plantillas de ARN y clonarlos después de que los intrones se han eliminado (antes de introducir el ADN eucariota en el hospedador). Tras la transcripción de ADN en ARNm en una célula eucariótica, ésta lo procesa eliminando los intrones y añadiendo una cola poli-A y un terminal GTP. Después se extraen las cadenas de ARNm “maduro” de la célula, la cola poli-A se hibrida sobre un oligonucleótido poli-T (porque, aunque existen otras alternativas, la transcriptasa inversa necesita un cebador de doble cadena para comenzar a trabajar), y se añaden estos componentes a las células procarióticas junto con la transcriptasa inversa y las bases A, T, C y G. La transcriptasa inversa recorre la cadena de ARNm y sintetiza la cadena de ADNc, complementaria según la correspondencia de bases (Figura 10).

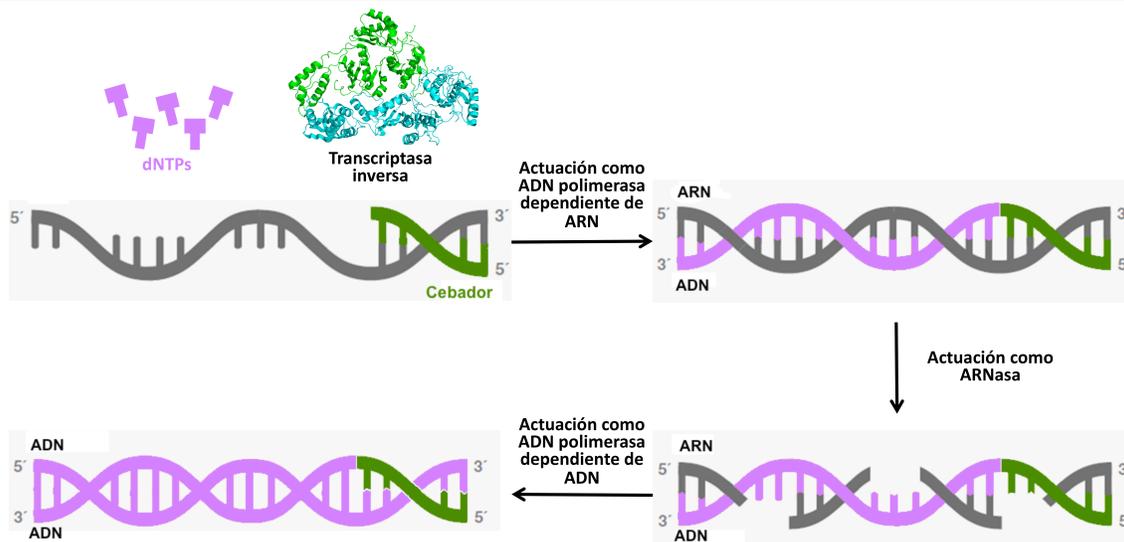


Figura 10. Transcriptasa inversa.

La clonación del ADNc que codifica la proteína “**receptora de antígenos de los linfocitos T**”, realizada con éxito en 1984, fue un hito en la inmunología al permitir conocer el mecanismo de funcionamiento de estos linfocitos (28). Los receptores de antígenos de los linfocitos T actúan como sensores que detectan la presencia de células invasoras y de células infectadas por virus, enviando una señal para eliminarlas.

### 2.10. Mecánica de los genes. Las cuatro “R”

Desde finales de la década de los cincuenta hasta los años setenta la fisiología de los genes centró el interés de los investigadores, descubriéndose que por la acción de

determinadas señales éstos podían **Regularse** (activarse y desactivarse), **Replicarse**, **Recombinarse** y **Repararse**. Estos conocimientos empezaron a explicar cómo los genes construyen, reproducen, conservan y reparan a los seres humanos, y cómo se ven afectadas la identidad y la salud de éstos.

El descubrimiento de la **regulación genética** se inició a finales de los años cincuenta estudiando el crecimiento de *Escherichia coli*, una minúscula bacteria del intestino que puede sobrevivir nutriéndose de glucosa y de lactosa. **Jacques Monod** descubrió que cuando se añadían estos dos azúcares al cultivo bacteriano, las células de *E. coli*

consumían primero la glucosa y, tras un pequeño parón, la lactosa. Para el científico, este hecho era consecuencia de un reajuste metabólico: cuando las bacterias pasaban de la glucosa a la lactosa se inducía la producción de enzimas específicas para digerir esta última, y cuando pasaban de nuevo a la glucosa como nutriente, dichas enzimas desaparecían y reaparecían las que metabolizan la glucosa. En consecuencia, los genes podían conectarse y desconectarse como un interruptor de corriente. En colaboración con **François Jacob** y el bioquímico norteamericano **Arthur Pardee**, un especialista en genética microbiana, Monod descubrió tres principios fundamentales en la regulación de los genes. En primer lugar, el ADN se mantiene intacto cuando un gen es conectado o desconectado, lo que cambia es la cantidad de ARN que produce el gen (cuando el ADN está conectado se le induce a generar más mensajes de ARN y por tanto más enzimas). Además, la producción de ARN está regulada coordinadamente, de forma que cuando la fuente de azúcar pasa a ser la lactosa las bacterias activan uno o varios genes que lo controlan todo y que Monod llamó **operón**. El operón de la lactosa está a su vez controlado por una sola proteína que, cuando detecta la adición de lactosa al medio de cultivo, altera su estructura molecular y desbloquea los genes implicados en su transporte y digestión (29). Finalmente, delante de cada gen hay secuencias anexas de ADN (aunque pueden también encontrarse en los extremos y en la mitad de los genes) que actúan como **señales específicas de reconocimiento o etiquetas**. Cuando una determinada proteína detecta un azúcar en el medio de cultivo, reconoce una de estas etiquetas y activa o desactiva los genes correspondientes para producir más ARN y generar las enzimas necesarias para digerir el azúcar. En resumen: **un gen es una combinación de secuencias codificantes y reguladoras**, por lo que no solo posee información para codificar una proteína sino también sobre cuándo y dónde producirla.

La regulación de genes activados o desactivados por proteínas describe el mecanismo por el que se puede generar complejidad dentro de una célula, pero no explica cómo se duplican los genes cuando una célula se divide en dos (la **replicación genética**). Parecía obvio que cada hebra de ADN podía generar una copia de sí misma, pero este proceso debería estar controlado por alguna enzima. Ésta se denominó “**ADN polimerasa**”, y fue encontrada por el bioquímico **Arthur Kornberg** (discípulo de **Severo Ochoa**) en 1958 depurando residuos bacterianos de cultivos de *E. coli* hasta conseguir un preparado enzimático casi puro. Dicha enzima es producto de un gen que puede activarse o desactivarse por diversas señales o reguladores. Si todo está “en orden”, las células harán copias de su ADN cuando estén listas para dividirse, pero si los propios reguladores actúan de forma caprichosa nada puede detener su multiplicación continua y se origina el cáncer. Con la ADN polimerasa podía crearse un gen a partir de sus subunidades químicas, aunque hoy se sabe que la replicación del ADN requiere además otras proteínas para desplegar la doble hélice y asegurar que la

información genética se copia con exactitud.

En 1955 **Ochoa**, junto con su discípula **Marianne Grunberg-Manago**, habían aislado del colibacilo la enzima que cataliza la síntesis de ARN, denominada en un principio “**polinucleótido-fosforilasa**” y posteriormente **polirribonucleótido nucleotidil-transferasa** (30). El hallazgo de una enzima inédita, que hacía desaparecer el ADP de la muestra de estudio fue fortuito, puesto que la científica estudiaba el papel del ATP, la “moneda” energética celular. Una vez aislada, esta enzima catalizaba *in vitro* la síntesis de polirribonucleótidos a partir de ribonucleótidos difosfato, permitiendo la preparación de polinucleótidos sintéticos con distinta composición de bases. Tuvieron mucha suerte, porque *in vivo* (en otras condiciones) la reacción catalizada discurre “al revés” y la misma enzima degrada el ARN. **Ochoa y Kornberg compartieron el Premio Nobel de Fisiología o Medicina en 1959**.

Hay que mencionar aquí los trabajos de **Margarita Salas** (otra discípula de Ochoa) con el **fago Φ29**, un virus que posee solo 20 genes e infecta a *Bacillus subtilis* y otras bacterias del mismo género. Estos trabajos condujeron a la determinación de la direccionalidad de la lectura de la información genética y al descubrimiento y caracterización de la enzima **ADN polimerasa de dicho fago**, que tiene múltiples aplicaciones biotecnológicas debido a su gran capacidad de amplificación del ADN, por lo que su patente es una de las más rentables de España en su campo (31).

Las unidades de información genética contenidas en el ADN y empaquetadas en los cromosomas codifican mensajes para construir proteínas y determinan la forma y función de un organismo vivo. Así queda explicada la pregunta de Mendel de cómo lo semejante engendra lo semejante pero, aunque es obvio que para generar evolución es necesaria la diversidad genética, no queda resuelto el enigma de Darwin de cómo lo semejante engendra lo desemejante.

La diversidad puede generarse por la alteración de las secuencias de ADN inducida por productos químicos, rayos X u otros agentes; por errores cometidos en la copia de los genes (la replicación); y por intercambio o **recombinación** entre cromosomas. Como ya se ha comentado, estas recombinaciones pueden ocurrir si el ADN de un cromosoma materno se intercambia con el paterno generando un gen híbrido de ambos, pero también por procesos más complejos. Cuando se daña el ADN y la información genética resulta amenazada, el gen puede copiarse de la copia de su pareja en el cromosoma, de forma que una copia materna puede ser reescrita a partir de la copia paterna y originar un gen híbrido.

En la fisiología de los genes hay una cuarta “R” esencial para la supervivencia de los organismos: la **Reparación**. Gracias a varios genetistas, entre ellos **Evelyn M. Witkin** y **Stephen J. Elledge**, se han identificado muchas proteínas que, como las *checkpoint kinases* que regulan el ciclo celular, activan una respuesta celular tras detectar un daño en el ADN para repararlo, retardarlo, o detener la división celular. Estos mecanismos

no vamos a comentarlos en detalle, pero es obvio que si los genes que codifican estas proteínas mutan, puede producirse una acumulación de daños en el ADN que de lugar a más mutaciones y finalmente al cáncer.

### 2.11. ADN recombinante o ADN ligado. Enzimas de restricción

Esta tecnología trata de crear *in vitro* una molécula de ADN artificial por la unión de secuencias de ADN que provienen de dos organismos distintos. En general, cuando un virus penetra en una célula se despoja de su cubierta proteica y utiliza la maquinaria celular del hospedador para copiar sus genes y generar nuevas cubiertas dando lugar a millones de virus que salen de la célula. Sin embargo algunos virus, en vez de producir millones de nuevos virus tras la infección, insertan su ADN en el cromosoma celular del hospedador entrando después en un estado de letargo hasta que son activados por determinados estímulos.

El bioquímico **Paul Berg**, anteriormente mencionado, comenzó a pensar en 1968 en la posibilidad de utilizar alguno de estos virus como vehículo para incorporar un gen extraño en un cromosoma humano insertándolo previamente en el genoma vírico. Empezó a trabajar con el **simian virus 40 (SV40)**, que es capaz de instalarse en células de simios y de humanos con una gran compactibilidad y eficacia. El primer problema era que sus 7 genes, en vez de estar encadenados en forma de un collar abierto por los extremos a lo largo de los cromosomas como los genes humanos, forman un collar cerrado. Berg podía disponer de muchas de las enzimas bacterianas que en los años 60 habían aislado y purificado los microbiólogos, pero tendría que encontrar una que cortase este collar y otra que pegase un trozo de ADN extraño y creara un **gen híbrido (una quimera)**. Entre las enzimas bacterianas conocidas se encontraban las “**enzimas de restricción**”, unas endonucleasas que reconocen dianas específicas en el ADN siempre que determinadas bases de la secuencia de reconocimiento no estén metiladas y, actuando como unas “tijeras”, degradan el ADN “intruso” de los bacteriófagos que las atacan. Este ADN queda “**restringido**” (es decir, “**fragmentado**”) mientras que el propio está protegido porque las adeninas y citosinas de las dianas de restricción están metiladas.

Las enzimas de restricción serían decisivas para el desarrollo de la **ingeniería genética** y han servido para el avance en la fragmentación del genoma, la elaboración de mapas de restricción o el diagnóstico de enfermedades. En otras aplicaciones se han combinado con otras técnicas, como el clonaje de genes o genomas, la secuenciación, o la reacción en cadena de la polimerasa. Su descubrimiento permitiría **unir *in vitro* fragmentos de procedencia muy diversa** y diseñar construcciones genéticas capaces de replicarse en células huésped para obtener un gran número de copias idénticas a la original.

Tras múltiples esfuerzos, Berg y su colaborador **Davis Jackson** consiguieron en 1972 unir el genoma de SV40 a una pieza de ADN del bacteriófago lambda (fago  $\lambda$ ) y a tres genes de la bacteria *E. coli*, y denominaron a estos

genomas híbridos **ADN recombinante (32)**.

Cuando **Janet Mertz** se incorporó al grupo de Berg, descubrió que si utilizaba la enzima de restricción que le había proporcionado el microbiólogo **Herb Boyer** *EcoRI*, producida por *Eschericia coli RY13*, el proceso de creación de ADN recombinante era mucho más eficiente que el utilizado por Berg y Jackson, y podía hacerse en dos etapas en vez de en seis. Mertz pensó también en crear híbridos genéticos con genes de SV40 insertados en el genoma de *E. coli* y, de esta forma, crear bacterias portadoras de genes víricos en vez de virus portadores de genes bacterianos. Pero Mertz no pudo realizar estas experiencias porque Berg había impuesto una moratoria, que tuvo gran repercusión, para no transferir los híbridos de genes a células bacterianas ni a ningún organismo vivo mientras no se demostrara que el riesgo de estas manipulaciones era cero (33). Combinando genes de diversos organismos podrían diseñarse genes a voluntad y serían posibles la ingeniería genética y la terapia génica en humanos, pero si se introdujeran estos híbridos genéticos en el organismo equivocado se podría desencadenar una catástrofe biológica y ecológica.

Muchas de estas cuestiones se debatieron en 1975 en la **Asilomar Conference on Recombinant DNA**, que tuvo una gran influencia en la regulación de la biotecnología, pero en ella no se afrontó la aplicación de estas tecnologías para manipular genes humanos en células humanas. Siguiendo las recomendaciones que había sugerido Berg en esta reunión, se creó en el seno de los Institutos Nacionales de Salud de EEUU el **Comité Consultivo del ADN Recombinante (RAC)**.

Además del SV40 y otros virus, existen unos minicromosomas llamados “**plásmidos**” que podrían ser también portadores de genes. Los plásmidos son collares circulares de genes que viven y se replican dentro de las bacterias y pueden transferirse entre distintas cepas. Al crecer y dividirse las bacterias, un plásmido al que se haya incorporado un gen extraño que se encontrara en su interior se multiplicaría, y al final se tendrían millones de réplicas exactas (“**clones**”) de un trozo de ADN. Puesto que el libre intercambio de genes es una característica de las bacterias, esta manipulación no traspasaba ninguna barrera evolutiva, por lo que **Herb Boyer** y **Stanley Cohen** decidieron obtener estas quimeras pensando que serían mucho menos peligrosas que los híbridos de virus y bacterias al estar compuestas exclusivamente por genes bacterianos.

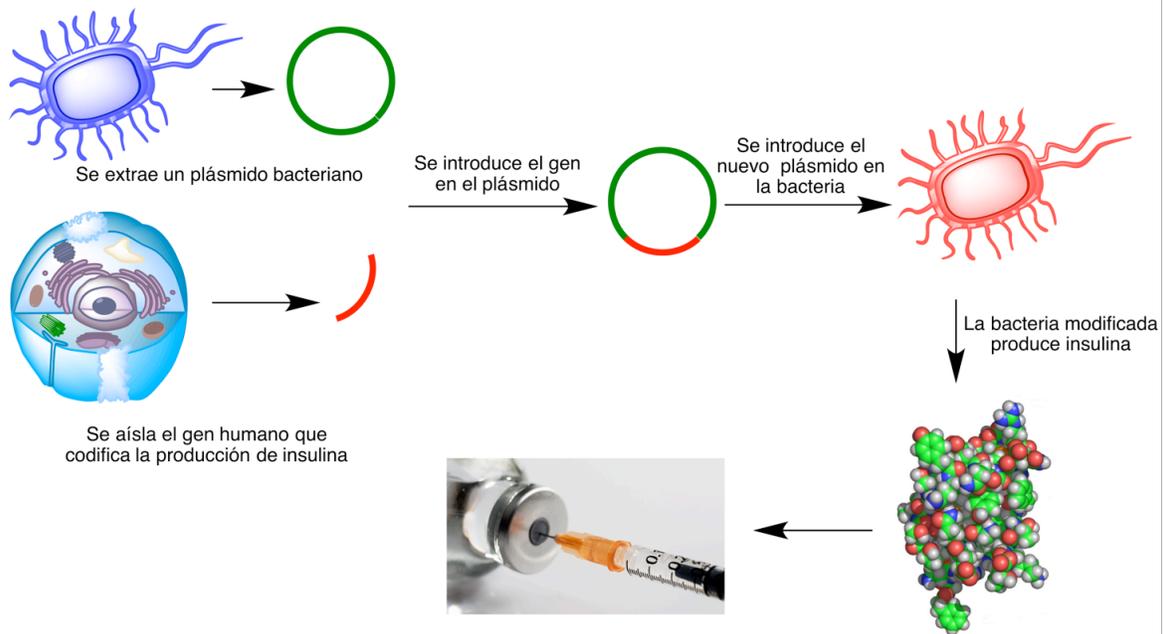
Cohen había aislado algunos plásmidos que contenían genes que conferían resistencia a ciertos antibióticos (34) y había logrado en 1973 inyectarlos en *E. coli* creando cepas de esta bacteria igualmente resistentes (35). Estos plásmidos podrían utilizarse para seleccionar las bacterias que, tras haber adquirido un gen extraño, no morirían por la acción de los antibióticos y, una vez cultivadas, originarían millones de copias de la quimera genética.

### 2.12. Las bacterias como fábricas biológicas de fármacos o productos químicos

En 1975, la **insulina** se producía todavía a partir de páncreas de ternera y cerdo, (se necesitaban 7 toneladas para obtener 1 Kg de la hormona). Sanger había dilucidado en 1953 la secuencia de los 51 aminoácidos de esta enzima y había determinado que está formada por una cadena A con veintiún aminoácidos, y una B con treinta. Ambas están enlazadas por dos puentes disulfuro entre los residuos A7-B7 y A20-B19 (la cadena A contiene además un puente de disulfuro interno entre los residuos A6 y A11).

En 1976 **Herb Boyer** y el empresario **Robert Swanson** se asociaron para fundar **Genentech** (una contracción de *Genetic Engineering Technology*), la primera empresa biotecnológica que utilizaría las técnicas de clonación de genes para fabricar fármacos. Como Boyer no disponía del gen que codifica la insulina humana, pensó en crear los genes de las cadena A y B por separado añadiendo químicamente nucleótido por nucleótido, pero

la dificultad de la empresa le motivó a ensayar primero el proceso con la somatostatina, una proteína de 14 aminoácidos. En 1977 su equipo insertó en un plásmido bacteriano el gen de la somatostatina enganchado a un gen bacteriano, cultivó las bacterias transformadas, y éstas produjeron somatostatina. En Genentech se estudió este mismo proceso para la insulina, y en 1978 se obtuvieron las dos cadenas de insulina procedentes de cultivos bacterianos. Una vez purificadas se practicó su unión en un tubo de ensayo, lo que dio lugar a las primeras moléculas de **insulina recombinante** (Figura 11). En 1982, la Oficina de Patentes y Marcas de los Estados Unidos concedió a Genentech una de las patentes más lucrativas y discutidas para utilizar ADN recombinante a fin de producir proteínas como la insulina o la somatostatina en un organismo microbiano. El mismo año 1982 la empresa empezó a producir la hormona de crecimiento humana.



**Figura 11. Producción de insulina recombinante.**

La detección del “**síndrome de inmunodeficiencia adquirida**” (SIDA) en pacientes con hemofilia A sometidos a múltiples transfusiones que estaban siendo tratados con inyecciones de **factor VIII**, hizo pensar que la causa de este síndrome en estos pacientes era un contaminante de la sangre humana de la que se extraía el factor VIII (posiblemente un nuevo virus) y en la ventaja que supondría obtener éste biotecnológicamente, sin estar contaminado con sangre humana. El problema era que el factor VIII contiene 2.350 aminoácidos y su gen, que se encuentra en el cromosoma X, es demasiado grande para crearlo utilizando la química del ADN. Por ello se clonó su ADNc y se insertó en plásmidos que se introdujeron en células de ovario de hámster (muy eficientes en la producción de proteínas). Finalmente se purificaron las proteínas, obteniéndose en 1984 el **factor VIII recombinante**, que se comercializó en 1987.

En 1985 se clonó y expresó el gen de la **eritropoyetina** (EPO), el factor estimulante de la diferenciación y maduración de precursores de eritrocitos (36), lo que permitió el desarrollo de la **EPO recombinante** humana (37), que se utiliza en el tratamiento de la anemia en pacientes con enfermedad renal crónica y después de ciclos agresivos en la quimioterapia del cáncer. Además de los ejemplos mencionados, los microorganismos modificados genéticamente han permitido producir **interferones**, diversos **antígenos** como la vacuna contra la hepatitis B5 y la vacuna contra el virus del papiloma humano, etc.

En la actualidad, la **transferencia génica a organismos enteros** (o introducción de un gen foráneo en un organismo) puede tener muchas finalidades y realizarse de varias formas. Si se transfieren genes a células germinales se originan adultos en los que el gen insertado

se encuentra en todos los tejidos y además, estos genes se transmitirán a la progenie originando **organismos transgénicos**. También se pueden producir individuos transgénicos introduciendo un determinado gen en unas pocas células embrionarias que posteriormente se incorporan a un embrión. Así resultan **quimeras transgénicas** en las que los tejidos pueden derivarse de las células manipuladas o de las endógenas. Otro modo de modificar un organismo muy frecuente en terapias génicas humanas es la **manipulación *ex vivo***, en la que se aíslan células (generalmente sanguíneas o de la médula ósea) para modificarlas genéticamente *in vitro* y reintroducirlas en el organismo de partida.

Las técnicas de ADN recombinante también han permitido obtener **plantas transgénicas** resistentes a insectos, hongos, bacterias y herbicidas con alto contenido nutricional, así como la **clonación de animales**. Su desarrollo ha dado pie a la **terapia génica** y ha hecho posible la **edición genética**, ya que los genes no solo saben leerse sino también escribirse.

### 2.13. Secuenciación del genoma humano y otros genomas. PCR

A finales de los ochenta ya existía la tecnología para secuenciar el **genoma humano**, pero **secuenciar sus tres mil millones de pares de bases** era una tarea hercúlea. El **impulso** para acometer esta labor **provino del cáncer**, cuyo origen genético se conocía desde 1872 pero no se corroboró hasta finales de la década de los 70. Los cánceres son originados por células normales que han sufrido mutaciones en los genes que regulan su crecimiento, por lo que el objetivo esencial y la gran incógnita de la terapia contra estas enfermedades es encontrar cómo podría restablecerse el estado “apagado” de los genes alterados.

Las mutaciones causantes del cáncer pueden originarse por agresiones ambientales (luz ultravioleta, rayos X, humo del tabaco, etc.), que atacan al ADN y cambian su estructura química, por errores espontáneos en el proceso de copia del ADN en la división celular (por ejemplo, el cambio de una base por otra), por incorporación de los genes mutados a través de los virus (que son los portadores de los genes en el mundo microbiano), o por herencia. En 1993 ya se sabía que, independiente de la causa que las origina, un cáncer surge por acumulación de docenas de mutaciones (38). Para entender el cáncer y otras enfermedades hereditarias en las que están involucradas decenas de genes (como la esquizofrenia), los biólogos necesitaban revisar todo el genoma humano.

Tras varias reuniones fallidas celebradas entre los biólogos más involucrados, se llegaron a algunos acuerdos para iniciar esta tarea en una reunión convocada por **James Watson** en 1986. En ella, **Walter Gilbert**, uno de los pioneros en la secuenciación del ADN, estimó que se necesitarían unas cincuenta mil personas trabajando durante un año con un coste no excesivamente grande (unos 3.000 millones de dólares). En esta reunión se notificaron varios avances tecnológicos entre los que

destacaron el invento de **Leroy Hood** de una máquina semiautomatizada que podría aumentar entre 10 y 20 veces la velocidad de secuenciación por el método de Sanger, y la optimización que había logrado **Kary Mullis** de una técnica introducida en 1985 que era capaz de multiplicar una hebra de ADN millones de veces y aumentar la producción de un gen de forma exponencial. Los avances en esta técnica, que se denominó **reacción en cadena de la polimerasa (RCP o PCR)**, le valieron para obtener el Premio Nobel de Química de 1993. La técnica de Mullis fue fundamental en el desarrollo del **Proyecto Genoma Humano** porque para secuenciar genes se necesita disponer de éstos en cantidad, lo que es difícil cultivando células humanas (39).

La **PCR** es un método enzimático que utiliza dos secuencias cortas de oligonucleótidos (oligos) complementarias de los extremos 3' del molde de ADN (con sus terminales 3'-OH enfrentadas) denominadas **primers, iniciadores o cebadores**. Éstos permiten que se inicie la reacción de polimerización para sintetizar numerosas copias del fragmento de ADN comprendido entre ambos oligonucleótidos. La sucesión de una serie de ciclos en los que tiene lugar la desnaturalización del molde (que se disocia por una subida de temperatura a 96 °C permitiendo el acceso al ADN de oligos, nucleótidos y polimerasa), la estabilización de los híbridos con los cebadores por una bajada de temperatura a 50 °C, y la extensión de la síntesis catalizada por una ADN polimerasa termoestable a través de una subida a 72°C, origina una acumulación exponencial de fragmentos específicos cuyos extremos están definidos por los extremos 5' de los cebadores. También son necesarios algunos cationes como el  $Mg^{2+}$  **cofactores de la enzima**. Hoy el proceso está automatizado y se utiliza sobre todo en el ámbito de la investigación forense.

Tanto la puesta en marcha del Proyecto Genoma Humano, que oficialmente tuvo lugar en enero de 1989, como su desarrollo, se encontraron con múltiples controversias administrativas y científicas. La primera provino del neurobiólogo **Craig Venter**, que propuso ir más rápido ignorando el ADN intergénico y los intrones, y abandonó en 1992 su trabajo en los Institutos Nacionales de Salud de EEUU creando su propio instituto (*The Institute for Genomic Research*, TIGR) dentro de una empresa denominada *Human Genome Sciences*. Desde 1993 a 1995, el equipo de Venter logró descifrar con su “técnica de escopeta” el genoma completo del bacilo ***Haemophilus influenzae***, causante de neumonías letales. A pesar de éste y otro éxitos decidió abandonar el mencionado Instituto y crear la empresa **Celera** (contracción de *accelerate*).

La técnica de ensamblaje clon por clon que se desarrollaba en el Proyecto oficial (en el que llegaron a participar 18 países) era más laboriosa y costosa, pero para algunos era la única que tenía sentido. Dicha técnica tuvo un éxito importante en 1998 cuando se completó el genoma del nematodo *Caenorhabditis elegans*, un organismo pluricelular que posee 18.891 genes (Figura 12) (40). El 36

% de las proteínas que codifica este gusano minúsculo eran similares a las de los seres humanos, pero el resto eran entonces desconocidas y tenían una gran diversidad de funciones. Había también genes agrupados en ciertos cromosomas que no codificaban ninguna proteína pero codificaban pequeñas cantidades de ARN (al que denominaron “micro ARN”) y regulaban a los genes de forma específica. Estos descubrimientos ampliaron la comprensión del gen ya que, además de codificar proteínas, podía también codificar ARN. Además, un gen no tenía que ser una pieza continua de ADN, sino que podía estar dividido en partes y vinculado a secuencias reguladoras que no tenían que situarse necesariamente adyacentes a él.

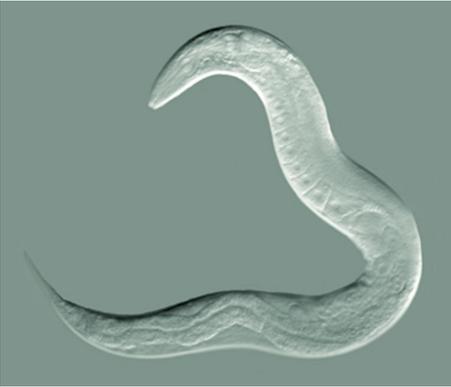


Figura 12. *Caenorhabditis elegans* (Wikimedia Commons).

Celera no se quedó atrás y ensambló en once meses el genoma de *Drosophila melanogaster*, aunque la estrategia de la escopeta había dejado fuera algunas partes de ciertas secuencias (41). Más del 60 % de los 289 genes humanos que se sabía que estaban involucrados en una enfermedad, tenían un homólogo en la mosca aunque, sorprendentemente, su genoma era casi la mitad del genoma humano (tenía 13.601 genes).

Desde 1999 hasta su renuncia en 2008, el reconocido genetista **Francis Collins** (Premio Príncipe de Asturias de Investigación Científica y Técnica de 2001) fue Director del Proyecto oficial relevando a Watson. Se había secuenciado una cuarta parte del genoma humano pero, ante la rapidez con que avanzaba Venter en Celera, Collins consiguió una inyección importante de dinero para resolver los problemas de ensamblaje. El 26 de junio del 2000 tuvo lugar en la Casa Blanca la comparecencia previamente pactada de Venter, Collins, el presidente Clinton, y el Primer ministro británico Tony Blair (que lo hizo por videoconferencia), para anunciar conjuntamente la inminente culminación del proyecto en ambos grupos (Figura 13). A la hora de publicar el resultado final hubo fuertes enfrentamientos en gran parte debidos a que Celera pretendía publicar su genoma y a la vez venderlo. Finalmente, ambos grupos publicaron los resultados del Proyecto Genoma Humano los días 15 y 16 de febrero de 2001 en dos revistas distintas, en *Science* Celera (42) y en *Nature* los grupos subvencionados con fondos públicos (43).



Figura 13. Venter, Clinton y Collins.

Estos resultados han permitido conocer mejor el funcionamiento de la biología humana. Gracias a ellos se sabe, por ejemplo, que el genoma humano es capaz de evolucionar en algunas células como las del sistema inmunitario, por lo que éstas pueden responder a la constante evolución de los gérmenes produciendo una diversidad de anticuerpos. El estudio comparativo de los genomas de distintos organismos ha dado un soporte molecular al trabajo de Darwin sobre la variación y la selección natural, y ha permitido concluir a casi todos los biólogos que los humanos compartimos un ancestro común con otras formas de vida. Esta relación se pone de manifiesto de múltiples formas, entre las que mencionaremos el mantenimiento del mismo orden de los genes en largos tramos de ADN en los cromosomas del ser humano y del ratón. Si se comparan los genomas de los chimpancés y los humanos se observa que su secuencia genómica es idéntica en un 96 %, pero en vez de los 23 pares de cromosomas que tienen los humanos los chimpancés tienen 24 pares. En algún momento de la evolución, ambos genomas se separaron y dos cromosomas presentes en estos últimos debieron fusionarse en el hombre para formar el cromosoma 2. Otro ejemplo que ha despertado mucho interés es el **gen FOXP2**. Su secuencia es muy estable en casi todos los mamíferos, pero en el hombre hay dos cambios importantes que ocurrieron aparentemente hace solo cien mil años y pueden haber contribuido al desarrollo del lenguaje. Otra característica que distingue al genoma humano del de otras especies del planeta es su baja diversidad genética: a nivel de ADN todos los hombres son idénticos en un 99,9 % mientras que en otras especies la diversidad del ADN es diez o incluso cincuenta veces mayor.

Varios descubrimientos del genoma han abierto múltiples cuestiones. Por ejemplo, es desconcertante saber que el 98 % de nuestro genoma esté reservado a larguísimos tramos de ADN intercalados entre los genes (**ADN intergénico**) o situados dentro de ellos (**intrones**) que no codifican proteínas ni ARN. Lo más probable es que existan para regular la expresión de genes o para otras misiones que no se comprenden todavía, aunque atrevidamente se han denominado “**ADN basura**”. También son en buena parte incomprensibles algunas secuencias de 300 pares de bases, como las “**secuencias Alu**” muy abundantes en el genoma de los primates, que

son elementos móviles que aparecen y desaparecen millones de veces, o los miles de “cadáveres” de genes que antes fueron funcionales a los que se llama “pseudogenes”.

Sorprende también que nuestro genoma es **en gran medida no humano**, ya que tiene intercalados fragmentos de ADN que provienen de antiguos virus y que ahora permanecen en gran medida silenciados. Según un estudio publicado en 2016, entre el 40 y el 80 % del genoma humano procede de alguna invasión viral arcaica. Fueron genomas de retrovirus que infectaron células germinales experimentando un proceso de transcripción inversa (44). Uno de estos genes procedentes de virus ancestrales cuya actividad parece ser muy importante es el **gen Arc**, que se localiza en el cromosoma 8 humano y está presente también en muchos vertebrados. Descubierta en 1995, este gen codifica una proteína de origen viral asociada al citoesqueleto (*Activity-Regulated Cytoskeleton-associated protein*) (45) que tiene un papel esencial en la plasticidad sináptica y en la formación y almacenamiento de la memoria en el cerebro. Cuando se activa una sinapsis, el gen *Arc* se activa y produce ARN que codifica la correspondiente proteína, cuyo comportamiento es semejante al de los virus cuando infectan las células hospedadoras. Su alteración se ha relacionado con diversos trastornos neurológicos, como el Alzheimer o la esquizofrenia (46).

Además del Proyecto Genoma Humano, actualmente están en marcha otros proyectos genoma globales como el *Earth Microbiome Project*, creado el año 2010 para avanzar en el conocimiento de los principios que gobiernan el mundo de las bacterias y las arqueas (47), o el *Earth BioGenome Project*, recientemente propuesto por varios científicos liderados por **Gene Robinson**. En éste se pretende secuenciar, catalogar y analizar los genomas de todas las especies eucariotas, una tarea que según los expertos se podrá completar en diez años con un presupuesto de unos 3.800 millones de euros y que requerirá una capacidad de almacenamiento digital de 200 petabytes (un PB equivale a  $10^{15}$  bytes) (48).

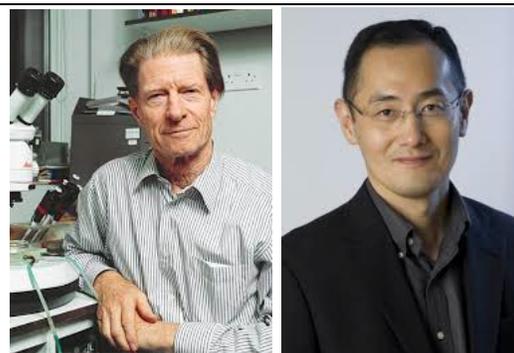
#### 2.14. Epigenética

El estudio de cómo afectan las señales ambientales al genoma de una célula y al uso de sus genes fue denominado **epigenética** (por encima de los genes) por el embriólogo inglés **Conrad Hal Waddington** en su famoso libro “*The Waddington’s epigenetic landscape*”, publicado en 1957. Hoy día, este término hace referencia a los fenotipos heredables que resultan de cambios en el cromosoma sin alteraciones en la secuencia primaria de ADN.

Los primeros experimentos de transplante de núcleos se realizaron en anfibios debido a que los huevos fecundados son de gran tamaño (1 a 2 mm) y la embriogénesis ocurre fuera del cuerpo materno. En 1958, el estudiante de postgrado **John Bertrand Gurdon** descubrió que al reemplazar el núcleo de una célula del ovocito de una rana por el de una célula madura del

intestino de otra rana se desarrollaba un renacuajo normal. En consecuencia, el óvulo no era más que un recipiente para el genoma injertado de otra célula (49). Era la **primera clonación de un animal adulto** y sus variaciones pudieron generalizarse a otros animales, lo que condujo a la famosa clonación de la **oveja Dolly**.

El experimento de Gurdon demostraba que el ADN de la célula madura tiene toda la información necesaria para desarrollar todas las células del un organismo y que aunque las células somáticas estén especializadas, **la especialización es reversible**. La técnica iniciada por Gurdon se denominó **transferencia nuclear de células somáticas** (*somatic cell nuclear transfer*, SNCT), y su descubrimiento le valió para compartir con **Shinya Yamanaka** el Premio Nobel de Fisiología o Medicina de 2012 (Figura 14).



**Figura 14. John Bertrand Gurdon y Shinya Yamanaka.**

Actualmente, la transferencia nuclear está legalizada en ciertos países y se aplica por ejemplo a las parejas en las que la mujer tiene una mutación en un gen mitocondrial importante. El núcleo de un óvulo de la madre fecundado con el esperma del padre se extrae y se inyecta en un óvulo enucleado de una donante que aporta las mitocondrias “normales”. En consecuencia, ya existen “**hijos de dos madres y un padre**”.

A Gurdon le intrigaba el alto porcentaje de fracasos que se obtenía en los experimentos de transferencia del núcleo de una célula del intestino de rana al ovocito enucleado de otra. ¿Por qué le costaba tanto al genoma de una rana adulta regresar al estado embrionario? Debía de haber marcas epigenéticas que dificultaban este regreso.

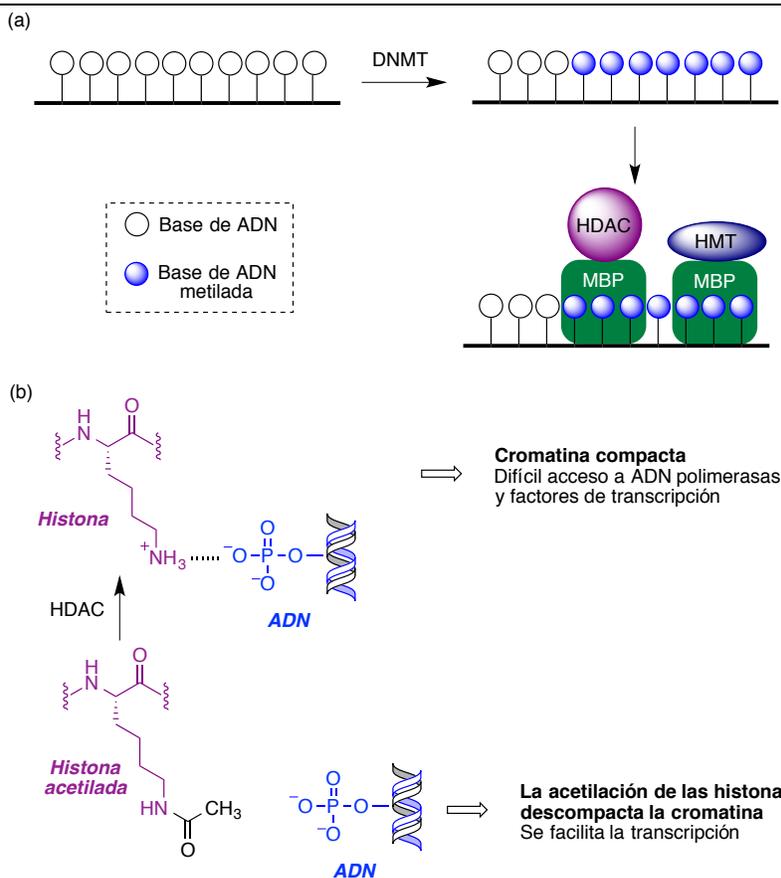
En 1966 **Mary Frances Lyon**, una antigua alumna de Waddington, visualizó por vez primera un cambio epigenético en células de ratones. En sus experimentos de tinción de cromosomas, todos los pares aparecían con idéntica pigmentación menos el par de cromosomas XX de todas las células en los animales hembra. En estas células, uno de los dos cromosomas X estaba desactivado, su secuencia de ADN era idéntica a la del otro cromosoma X pero sus genes no producían ARN, por lo que todo el cromosoma estaba “silencioso”. El proceso se denominó **lionización**, un fenómeno estocástico que ocurre en la embriogénesis temprana femenina para lograr una compensación de dosis génica respecto a los varones. En los mamíferos placentarios, la decisión de cuál de los

cromosomas X se inactiva se produce al azar, en unos casos se inactiva el cromosoma X del padre y en otros el procedente de la madre. En ciertos casos existen mecanismos que afectan el proceso normal y propician una inactivación sesgada que puede tener efectos clínicos relevantes, por ejemplo en mujeres portadoras de trastornos recesivos ligados al cromosoma X, como la hemofilia.

Cuando se estudió este asunto a finales de los años setenta se descubrió que el silenciamiento genético se debía a la metilación de las bases de algunas secuencias de ADN. Esta reacción estaba promovida entre otros agentes por un gen de ARN situado en el cromosoma X que se denominó **Xist** (*X-inactive specific transcript*). La secuencia de ADN de la que se transcribe un ARN no codificante (ncRNA o npcRNA, que no se traduce en una proteína) se denomina a menudo gen de ARN. Este gen se expresa en los cromosomas inactivos pero no en los activos (50) y podría provenir de un gen que evolucionó a pseudogen (51).

El silenciamiento de los genes por medio de proteínas reguladoras (los **factores de transcripción**) se conocía desde los años 50, pero fue después cuando se supo que estos factores pueden reclutar otras proteínas para dejar marcas químicas permanentes en los genes que se conservan en el genoma. La **metilación del ADN**,

catalizada por enzimas DNMT (*DNA methyl transferases*), se realiza preferentemente en residuos de citosina situados en regiones del ADN en las que están concentrados la mayor parte de los factores de transcripción. Los cambios estructurales del ADN que produce esta metilación bloquean el enlace de dichos factores o reclutan represores de la transcripción denominados **MBDs** (*methyl binding proteins*), que subsequentemente reclutan histona desacetilasas (**HDACs**) e histona metiltransferasas (**HMTs**), produciendo el **silenciamiento de la expresión génica** (Figura 15a). En 1996, **David Allis** encontró otras marcas epigenéticas que tienen lugar en las histonas, proteínas que empaquetan al ADN y pueden cambiar la actividad de un gen si se modifican químicamente (52). La metilación o acetilación de residuos de lisina o arginina, o la ubiquitilación y fosforilación de residuos de serina y treonina son marcas que se producen en las histonas y podrían haberse transmitido de levaduras y gusanos. La acetilación del grupo amino de la lisina descompacta la cromatina y facilita la transcripción porque elimina la basicidad del grupo amino y su carga positiva, lo que debilita la interacción electrostática entre las histonas y el ADN dejando un espacio para que accedan al ADN los factores de transcripción y las polimerasas. Las histona desacetilasas eliminan los restos de acetilo y dificultan la expresión génica (Figura 15b).



**Figura 15. a) Metilación del ADN y silenciamiento de la expresión génica. b) La desacetilación de las histonas dificulta la expresión génica.**

Un óvulo posee factores (proteínas o ARN) capaces de

borrar estas marcas epigenéticas del genoma, pero revertir

la identidad de una célula adulta a su estado embrionario borrándolas todas es más difícil. Esta es la causa del alto porcentaje de fracasos en los experimentos de Gurdon. **Yamanaka** intentó identificar en un óvulo cuáles eran los factores capaces de revertir una célula de la piel de un ratón completamente desarrollado a una célula embrionaria y, tras infinidad de ensayos, redujo estos factores a las proteínas codificadas por solo cuatro genes (o **protooncogenes**). Cuando los introdujo en células maduras de piel de ratón consiguió que algunas se transformaran en algo parecido a las células embrionarias, ya que podían producir todos los tipos de células presentes en el organismo del ratón. El **protooncogen c-Myc** (el más importante ya que los otros tres son colaboradores) dirige la transcripción de ADN a ARN, por lo que desempeña un papel crítico en la selección de las proteínas que tiene que sintetizar la célula. En el experimento de Yamanaka c-Myc actuó como un factor de rejuvenecimiento, pero si se activa en las células de un organismo vivo se transforma en un oncogen que puede sobreexpresarse en varios tipos de cáncer mediante un mecanismo de amplificación. Esta realidad es una de las muchas que demuestran que, aunque actualmente se entiende cómo se utiliza la información de un solo gen para construir una proteína (el **código genético**) y puede determinarse el genoma humano, no se sabe prácticamente nada de cómo múltiples genes dispersos en este último coordinan la expresión de los genes en el espacio y en el tiempo para construir, mantener y reparar el organismo (el **código genómico**).

### 3. GENES Y MEDICINA

#### 3.1. Anomalías cromosómicas vinculadas a enfermedades

En 1956, utilizando una preparación con colchicina y una solución salina hipotónica en la que los cromosomas se descompactaban y podían contarse, el genetista **Joe Hin Tjio** determinó de forma definitiva que **los cromosomas humanos son 46** y que están agrupados en **23 pares** (53). El hallazgo de Tjio contribuyó a importantes avances en la aplicación de la genética a la medicina. Por ejemplo, al descubrimiento de que la **anomalía cromosómica** causante de la mayoría de los casos de síndrome de Down es la **trisomía del cromosoma 21**. Estas personas poseen 47 cromosomas en todas sus células porque el cromosoma 21, que tiene insertados trescientos y pico genes, presenta tres copias en vez de dos (54). El mismo año de su descubrimiento, se empezaron a examinar las células fetales de líquido amniótico aspirado para conocer el sexo del feto, y estos avances dieron paso al diagnóstico de anomalías cromosómicas *in utero* y a la confrontación entre el derecho a abortar de la mujer embarazada y los derechos del feto por su condición de persona.

Para los defensores del aborto selectivo posterior al **diagnóstico genético prenatal**, el derecho a nacer debería reformularse como el derecho a nacer sin anomalías. Es **una nueva forma de eugenesia** que, en vez de basarse en características físicas o mentales (fenotipos), se basa en sus determinantes genéticos. Se trata de preservar al feto de ciertos trastornos genéticos, pero también se podría

utilizar para la elección de los gametos con fines reproductivos, una **“selección germinal”** de espermatozoides u óvulos portadores de genotipos óptimos. Dejando aparte el problema moral, la crítica principal a esta nueva eugenesia se debe a las variaciones que se observan entre pacientes con enfermedades monogénicas y poligénicas portadores de una misma mutación, lo que demuestra que las interacciones entre los genes humanos y las enfermedades son complejas.

En 1957, **Victor McKusick** y **Arno G. Motulsky** abrieron en EEUU sendas clínicas de **genética médica**. McKusick fue el pionero en el estudio de los nexos entre los genes y numerosos síndromes patológicos. Estudiando primero las enfermedades genéticas más conocidas, como la hemofilia o la anemia falciforme, fue creando un enorme catálogo de fenotipos, rasgos y trastornos genéticos monogénicos o poligénicos que eran leves en unos casos pero en otros ponían la vida en peligro. En los trastornos monogénicos, una mutación o aberración cromosómica es necesaria y suficiente para causar la enfermedad, mientras que en las enfermedades poligénicas el efecto de un gen concreto es más tenue y el componente genético puede ser necesario pero no suficiente para causar la enfermedad. También advirtió que las mutaciones de un solo gen pueden manifestarse en diferentes órganos causando distintas patologías, pero se dan casos (como la hipertensión) en que influyen múltiples genes en una sola patología. También hay casos de **“penetrancia incompleta”** o **“expresividad variable”**, en los que aunque esté presente una mutación en el genoma su capacidad para manifestarse física o morfológicamente no es completa y las manifestaciones clínicas son variables. La **penetrancia genética** es la proporción de individuos de una población que expresan el fenotipo patológico, entre todos los que presentan un genotipo portador de un alelo mutado. La **expresividad variable** es la variación de las manifestaciones clínicas (tipo y severidad) de trastornos genéticos entre individuos afectados. Por ejemplo, aunque la herencia de mutantes del gen BRCA1 aumenta el riesgo de cáncer de mama, sus distintas variantes tienen distintos niveles de penetración o manifestación clínica.

A pesar de que la lista de enfermedades humanas influidas por alteraciones genéticas había crecido exponencialmente y que las técnicas de clonación y secuenciación de genes hacían pensar en que la identificación de los genes responsables de enfermedades era factible, la tarea era abrumadora. Por ejemplo, si en un gen ligado a una enfermedad está mutado un solo par de bases ¿cómo encontrar esta mutación entre los 3.000.000.000 de pares de bases que aproximadamente tiene el genoma humano?

A mediados de los años 1970, **Kerry Kravitz** y **Mark Skolnick** trataron de identificar al gen causante de la **hemocromatosis**, una enfermedad producida por la mutación de un gen que regula la absorción de hierro en el intestino. Al ser una mutación recesiva, solo se manifiesta en individuos con dos copias defectuosas, una del padre y otra de la madre. Afortunadamente, se descubrió que este

gen está vinculado a otro localizado en el cromosoma seis que codifica una proteína de respuesta inmunitaria de la que existen muchas variantes fácilmente detectables. Por tanto, el gen causante de la hemocromatosis también tenía que estar en el mismo cromosoma. Fue un golpe de suerte, porque el hallazgo no hubiera sido tan sencillo si el gen vinculado no fuera fácilmente detectable.

En 1978 empezaron a utilizarse los “**polimorfismos**” de ADN situados cerca de un gen ligado a una enfermedad como **marcadores** para localizarlo. Los polimorfismos son variaciones en la secuencia de ADN, semejantes a los alelos en términos de genes, que pueden existir en los intrones y se han producido a lo largo de siglos de evolución. Estas variantes son invisibles al ojo humano y no pueden distinguirse por rasgos biológicos o físicos, pero sí por diferentes técnicas moleculares. En una de ellas se utilizan enzimas que cortan ADN y reconocen una secuencia de bases, pero no otra análoga con una secuencia de bases diferente (por ejemplo distinguen entre AGTACCG y ACTACCG). En 1980 se publicó cómo la vinculación de un rasgo genético a una de estas variantes podía servir para una **localización cromosómica aproximada del gen** (55), un método que se utilizó por un equipo de investigación liderado por **Nancy Wexler** en la identificación en 1994, tras diez años de búsqueda, del gen responsable del **corea de Huntington** (es un gen dominante y basta una sola copia para producir una enfermedad que acaba siendo mortal). En este largo proceso se estudiaron las muestras de sangre de enfermos norteamericanos y las que Wexler enviaba desde una zona de Venezuela donde esta enfermedad era muy frecuente. El ADN de las células sanguíneas se fraccionaba con numerosas enzimas buscando una variante polimórfica que pudiera servir de marcador hasta que finalmente se encontró una variante de ADN situada en el cromosoma cuatro que estaba claramente asociada a la enfermedad. La identificación de este gen requirió la división y subdivisión del cromosoma cuatro, el aislamiento e inserción de las partes más pequeñas en cromosomas de levaduras o bacterias para su clonación, y la secuenciación de estos clones hasta que se identificó el gen en un solo fragmento de ADN. Por último se compararon las secuencias del gen aislado de individuo sanos y de pacientes para confirmar que en estos últimos estaba alterado. La proteína que se encuentra alterada en la enfermedad de Huntington es una de las más grandes del cuerpo humano (tiene 3.144 aminoácidos), y la mutación ligada a esta enfermedad neurodegenerativa no consiste en la alteración de uno o más de sus aminoácidos, sino en un aumento en el número de repeticiones de la secuencia del trinucleótido CAG (-CAGCAGCAG...) (56). Debido a estas repeticiones adicionales, cuyo número aumenta a lo largo de generaciones haciéndose más letal, la proteína codificada aumenta su tamaño y se agrega a las neuronas.

En 1985 se demostró que el gen de la **fibrosis quística** (FQ), una grave enfermedad que afecta a múltiples órganos y se manifiesta con bastante frecuencia en individuos de ascendencia europea, debe residir en alguna parte de un

segmento de ADN dentro de dos millones de pares de bases alrededor del cromosoma siete (57). La FQ se manifiesta cuando se heredan dos copias del gen mutado, mientras que los portadores de una sola copia mutada suelen ser asintomáticos. En la búsqueda de este gen se empleó una modificación de la metodología utilizada para el gen responsable de la enfermedad de Huntington: en vez de ir clonando trechos contiguos o parcialmente superpuestos del cromosoma se fue más deprisa por medio de “saltos”. Finalmente el gen de la FQ fue localizado en 1989, comprobándose que los niños afectados tenían dos copias mutadas, una del padre y otra de la madre. Se habían necesitado más veinticuatro equipos en todo el mundo, más de diez años y más de cincuenta millones de dólares para identificar un solo gen para una sola enfermedad. La mutación más común se produce por la delección de un triplete de bases de ADN, lo que origina la supresión de un aminoácido en la proteína que codifica y la pérdida de su actividad como transportadora del ion cloruro a través de las membranas. Tras la clonación del gen FQ se dispuso de una **prueba diagnóstica in utero** que permitía a los padres considerar el aborto de los fetos, y las parejas en las que ambos eran portadores del gen mutante podían optar por no concebir un hijo (58).

### 3.2. Diagnósticos genéticos

Además de los ejemplos comentados, desde mediados de los setenta a mediados de los ochenta se aislaron, secuenciaron y clonaron cientos de genes que tenían una función de interés médico o científico, aunque algunos de ellos se identificaron posteriormente. Por ejemplo el **gen BRCA1** (*breast cancer 1*), que es el más comúnmente asociado a las **formas hereditarias del cáncer de mama**, empezó a buscarse a principios de los años setenta por la genetista **Mary-Claire King** estudiando la herencia de los cánceres de mama y ovario. En 1988 se ubicó en una región del cromosoma diecisiete (59), pero no se aisló hasta 1994 (60). En este tiempo de búsqueda fue desconcertante su “**penetrancia incompleta**” ya que, aunque la presencia del gen mutante aumentaba diez veces el riesgo de cáncer entre las portadoras, no siempre “penetraba” su efecto. El interés de la empresa Myriad Genetics, responsable de su aislamiento, se centraba en desarrollar un diagnóstico genético que, finalmente, fue comercializado en 1996. Éste se realiza en las mujeres con antecedentes familiares analizando un frotis de células de la boca, amplificando el gen BRCA1 por la reacción en cadena de la polimerasa, secuenciándolo, e identificando los genes mutantes. Actualmente, cuando se detecta una mujer con un cáncer de mama o de ovario a causa de mutaciones en los genes BRCA1 o BRCA2, se aconseja detectar éstas no sólo a sus hermanas e hijas, sino también a los varones. Su penetrancia es menor en éstos, pero sus efectos son mucho más difíciles de prevenir porque pueden manifestarse originando distintos tipos de cáncer (próstata, melanoma, colon, páncreas o mama).

En general, los diagnósticos genéticos de personas que conocen con anticipación los riesgos de experimentar en el futuro graves patologías, pero no saben cuándo podrían

desarrollarse ni su grado, obligan a vivir con una gran ansiedad. Es importante señalar que asociar ciertos genes con enfermedades (gen del mal de Huntington, gen de la fibrosis quística, gen causante del cáncer de mama, etc.) no es correcto científicamente, porque la misión de los genes no es causar enfermedades y, si lo hacen, es porque sufren alteraciones. Los genes BRCA en su versión normal reparan el ADN cuando éste ha sufrido un daño, los cánceres de mama y de ovario aparecen cuando BRCA1 está mutado y no funciona. Incluso en los pacientes con BRCA1 mutado, el desarrollo de cáncer requiere múltiples desencadenantes.

El nexo genético de otras enfermedades que pueden presentarse *de novo* (sin antecedentes familiares) o por herencia, como la **esquizofrenia**, el **desorden bipolar**, o el **autismo**, se demostró en la década de los ochenta. Para avanzar en la identificación de los genes mutados desencadenantes de estas patologías ha habido que esperar al desarrollo de la **secuenciación en paralelo**, en la que el genoma se divide en decenas de miles de fragmentos de ADN que se secuencian en paralelo y luego se reensamblan con la ayuda de ordenadores. Esta tecnología y otras apuntan a que existen más de cien genes o regiones genéticas asociados a estas patologías, aunque solo se conocen unos pocos. La asociación más fuerte encontrada hasta el momento con la esquizofrenia implica variaciones en el **locus del complejo de histocompatibilidad (MHC, major histocompatibility complex)**, denominado también HLA (*human leucocytic antigen*, porque se creía que solo se expresaba en leucocitos). Este locus es un conjunto de genes ubicados en el cromosoma 6 que codifican antígenos de histocompatibilidad que activan procesos críticos en la generación de la **respuesta inmunitaria adaptativa** (específica para cada agente infeccioso). Para que ésta pueda mostrar todas sus características de especificidad, memoria, diversidad y discriminación entre lo propio y lo ajeno, los antígenos extraños deben ser procesados y presentados a los linfocitos T para que puedan ser reconocidos, y esta presentación está mediada por las moléculas MHC que se encuentran en la superficie de las células presentadoras de antígeno (APCs), entre otras. La **asociación entre esquizofrenia y MHC** se debe en parte a la existencia de múltiples alelos en los genes del componente complementario 4 que aumentan la expresión de la variante C4A respecto a la C4B en el cerebro. En consecuencia, **la proteína codificada por C4** (que estaba diseñada para dicha acción inmunitaria) se “reorienta” para eliminar sinapsis cerebrales (61). El número de sinapsis en bebés y en niños es aproximadamente el doble que en adultos, lo que permite a los bebés aprender rápidamente nuevas tareas a medida que crecen y se desarrollan. La “poda sináptica” es un proceso regulador cerebral que comienza en la adolescencia y se prolonga hasta la treintena, el periodo en que se suelen manifestar muchos síntomas de la esquizofrenia. En él se eliminan conexiones sinápticas entre neuronas para que el cerebro del adulto sea capaz de centrarse en tareas más complejas eliminando asociaciones simples construidas durante la etapa infantil.

Valorar el alcance del riesgo que corre una persona de padecer una enfermedad genética que todavía no se ha manifestado a través de diagnósticos genéticos no es tarea fácil, porque hay que considerar los distintos niveles de penetrancia de las mutaciones y las influencias ambientales. En los casos en que existen tratamientos profilácticos, como la mastectomía o la terapia hormonal en el caso del cáncer de mama hereditario, éstos pueden comportar riesgos y sufrimientos, y en casos como la esquizofrenia no tienen sentido porque no hay tratamientos profilácticos ni curativos. Muchos científicos opinan que el **diagnóstico prenatal y la interrupción del embarazo** cuando existen **mutaciones específicas** que originan enfermedades raras y devastadoras es una opción más sencilla que **secuenciar genomas con la esperanza de generar tratamientos a medida** para paliar los efectos de estas mutaciones. Pronto será posible diseñar pruebas prenatales para detectar irregularidades en el genoma fetal (la **genética del nonato**), pero deshacerse de genes defectuosos supone deshacerse de personas.

Una alternativa que también produce vértigo ético es el **diagnóstico genético preimplantacional (DGP)**, que se realiza biopsiando embriones humanos en una etapa temprana antes de su implantación, por lo que es una forma de seleccionar fetos sin abortarlos (62). Desde que se utilizó en 1989 el DGP para seleccionar embriones, muchos países impusieron inmediatamente límites estrictos a su uso, pero estas limitaciones no evitaron que en ciertos países como India y China se utilizara el DGP para la selección de niños varones.

La intervención posterior a un diagnóstico prenatal o preimplantacional es **una forma de eugenesia** que sirve para separar los débiles de los fuertes. Hasta hace poco tiempo se ha regido por tres principios tácitos: el hallazgo de variantes genéticas singulares y altamente penetrantes con una probabilidad cercana al 100 % de desarrollarse (como el síndrome de Down o la fibrosis quística), variantes genéticas causantes de enfermedades que provocan grandes sufrimientos o son incompatibles con una vida “normal”, y tomar la decisión de forma voluntaria tras recibir todo tipo de advertencias médicas. Aunque los conceptos de “sufrimiento extraordinario”, “normalidad” y “libertad de elección” son relativos, parece que estos tres límites han sido útiles, aunque no se esté de acuerdo con estos métodos. Un problema más grave todavía es que se traspasen estos límites, simplemente porque tenemos en nuestras manos “**el saber y el poder**”.

#### 4. TERAPIA GÉNICA

La terapia génica es un recurso médico que pretende combatir ciertas enfermedades mediante la **introducción de genes específicos en las células del paciente**. La novedad radica en que **el agente curativo es un gen**. Estas terapias pueden efectuarse *ex vivo*, manipulando *in vitro* las células del paciente que se devuelven al organismo de partida por lo que no existe rechazo inmunológico, o *in vivo*, introduciendo el gen terapéutico desnudo o en el interior de un vector viral.

En 1974 se había investigado en ratones si los genes insertados en virus SV40, posteriormente incorporados a células embrionarias tempranas, podían transmitirse verticalmente de ratón a ratón y de generación a generación, originando organismos modificados genéticamente de forma permanente. En estos experimentos, las células embrionarias infectadas con virus manipulados se mezclaron con células embrionarias no infectadas y esta mezcla se implantó en ratones. Los genes insertados en el virus deberían encontrarse en algunos de los nuevos ratones engendrados si, además de formarse células de la sangre, intestino, etc., se formaban unos pocos gametos. Sin embargo, los experimentos demostraron que la expresión de los genes virales en espermatozoides y óvulos estaba bloqueada, ya que su presencia era extraordinariamente escasa (63), por lo que se investigó la terapia génica en **células madre embrionarias** o **células ES** (*embryonic stem cells*). Como ya se ha comentado, años después se sabría que los genes virales se habían silenciado con marcas epigenéticas.

#### 4.1. Células madre embrionarias (células ES). Animales transgénicos

Además de renovarse a sí mismas como hacen las células que están presentes en la mayoría de los órganos para reemplazar a las células muertas, **las células ES pueden originar cualquier tipo de célula funcional**, pueden cultivarse en placas Petri, congelarse y conservarse vivas después de descongelarse, y reproducirse en medios líquidos. Además, es relativamente fácil extraer de ellas su genoma e insertar en él otros genes y, lo que es más sorprendente, cuando se mezclan con células embrionarias y se implantan en un útero de ratón, las modificaciones a las que han sido sometidas se transfirieron al organismo engendrado provocando en él un cambio permanente. Otra ventaja importantísima frente a los virus es que las células ES permiten modificar lugares específicos del genoma de un animal si se realizan algunas manipulaciones (64), mientras que los genes víricos se insertan al azar y no se puede predecir el lugar en que se van a insertar debido a que el genoma humano es demasiado grande.

En los años noventa, los **ratones “transgénicos”** engendrados por terapia génica se crearon a centenares con el fin de descifrar la función de los genes, y muchos de ellos se utilizaron como modelo para el estudio de enfermedades. Sus alteraciones genéticas les forzaban a desarrollar distintas patologías, destacando los que desarrollaban tumores por haberles introducido oncogenes porque han sido decisivos para el **estudio de tumores malignos**. Al intentar aplicar estas técnicas a **células madre embrionarias humanas** se observó que éstas no tenían la misma capacidad para ser manipuladas que las células ES de ratón. Cuando se transplataban células ES humanas en animales, solo se lograba que produjeran ciertas capas de tejido embrionario humano sin coordinación anatómica ni fisiológica. Tampoco era factible ni ética ni tecnológicamente intentar la modificación genética de un embrión unos cuantos días o semanas después de la concepción, por lo que la **modificación transgénica de embriones humanos** estuvo detenida por un tiempo.

#### 4.2. Primeros pasos en la modificación transgénica de embriones humanos

El virólogo y genetista **Richard Mulligan**, aprovechando que los retrovirus injertan su genoma en el de las células fácilmente y de forma permanente, diseñó en 1986 unas variantes de virus que no podían salir de las células y propagar infecciones. El equipo de **William F. Anderson** y **Michael Blaese** las ensayó en 1987 para introducir el **gen humano ADA (adenosina desaminasa)** (65). Este gen, que en el hombre se sitúa en el cromosoma veinte, codifica la enzima que metaboliza la adenosina del organismo y la convierte en inosina. Su deficiencia es un trastorno raro y hereditario que si no se trata puede ser fatal, sobre todo en la primera infancia. Los individuos en que este gen se encuentra mutado se ven afectados por una grave inmunodeficiencia debido a que la toxicidad de los metabolitos de adenosina acumulados afecta sobre todo a los linfocitos T (Figura 16).

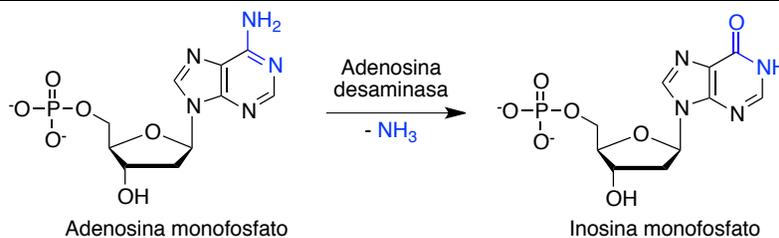


Figura 16. Reacción catalizada por adenosina desaminasa.

Entre las opciones terapéuticas para su tratamiento se encuentra el **transplante de células madre hematopoyéticas** (cuyo éxito depende de encontrar un donante adecuado), la **terapia de reemplazamiento** con pegadema bovina (**PEG-ADA**) que requiere una inyección intravenosa mensual y puede generar anticuerpos (66), y la **terapia génica**. Los primeros resultados obtenidos por Anderson y Blaese con células

madre de ratones y de monos fueron desalentadores porque el grado de implantación del gen era muy bajo. Tampoco obtuvieron la aprobación oficial para aplicar su protocolo en humanos. Por ello, pensaron en prescindir de las células madre e insertar el gen directamente en los linfocitos T. Este nuevo protocolo fue muy discutido, pero finalmente se aprobó en 1990 un ensayo piloto para determinar su seguridad en dos pacientes. Éstas recibieron células T

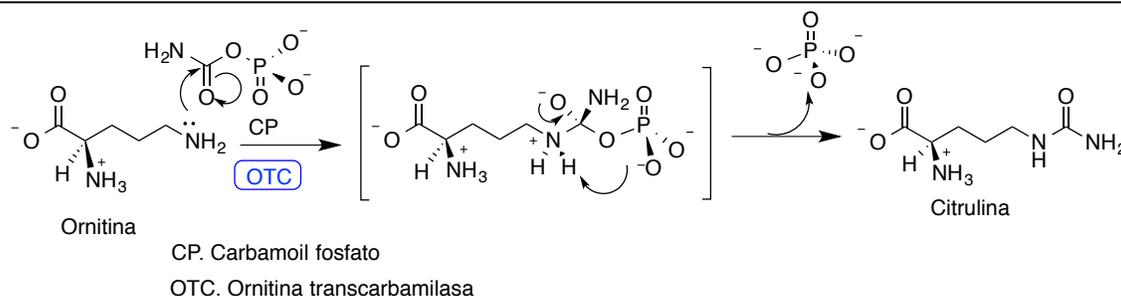
extraídas de su sangre que fueron infectadas posteriormente con el virus en el que se había insertado el gen ADA y finalmente multiplicadas en una placa Petri. Los resultados de estos dos ensayos indicaron que las **células T infectadas con retrovirus** podrían introducirse con seguridad en organismos humanos, pero no sirvieron para valorar su eficacia curativa porque después de estos ensayos las dos pacientes continuaron siendo tratadas con PEG-ADA por vía intravenosa.

#### 4.3. Inicio de la terapia génica

Los datos que proporcionaron estos ensayos eran insuficientes, pero despertaron el entusiasmo de los defensores de la **terapia génica**. Era una eugenesia positiva en la que los científicos no eliminaban seres humanos con genes defectuosos, sino que trataban de corregir la acción de éstos haciendo al genoma “un poco mejor”. Si se introduce un cambio genético en células no reproductivas, como las de la sangre o los músculos, solo se altera una generación del genoma porque el gen introducido se pierde cuando muere la célula, pero si el cambio afecta a las células embrionarias (óvulos o

espermatozoides) el cambio permanece y se transmite a las futuras generaciones.

En 1993 los pediatras Mark Batshaw y James Wilson empezaron a experimentar una terapia génica para curar a niños con deficiencia de la enzima **ornitina transcarbamilasa (OTC)**, también llamada ornitina carbamoiltransferasa). Esta enzima es esencial en el segundo de los cinco pasos del complejo **ciclo de la urea** de los mamíferos, en el que el amoniaco procedente fundamentalmente del metabolismo proteico y depositado en las mitocondrias de los hepatocitos se transforma en urea, que pasa al torrente sanguíneo y se excreta en la orina. Si hay deficiencia de OTC, el amoniaco daña las células y los vasos sanguíneos, atraviesa la barrera cerebral, y envenena las neuronas, de tal forma que la mayoría de los pacientes fallecen en la infancia. La OTC cataliza la reacción entre el carbamoil fosfato y la ornitina para formar citrulina y fosfato. La citrulina así formada pasa al citoplasma, donde continúa el resto de este ciclo (Figura 17).



**Figura 17. Reacción catalizada por la enzima OTC.**

El plan de Batshaw y Wilson era inyectar el gen en el hígado de los pacientes a través del torrente sanguíneo utilizando como sistema de transporte adenovirus que no se asociaran con ninguna enfermedad grave. El proceso se ensayó en ratones con éxito, pero los experimentos con monos necesitaron concentraciones tan altas de virus que provocaron una gran respuesta inmunitaria. En 1997, tras modificar muchos genes virales y disminuir la dosis para redoblar la seguridad, solicitaron al RAC el visto bueno para realizar un ensayo en humanos. Éste se realizó el 13 de Septiembre de 1999 con **Jesse Gelsinger**, un chico de 17 años con una falta de OTC leve (es posible que en alguna de sus células se encontrara el gen normal porque su mutación no era heredada sino que se había producido en la gestación, Figura 18). Lamentablemente, la inyección del adenovirus portador del gen normal produjo una respuesta inmunitaria hiperactiva y graves trastornos en distintos órganos, hasta que el paciente finalmente falleció el 17 de Septiembre. Una investigación posterior sobre la responsabilidad de la Universidad de Pensilvania en su muerte encontró graves irregularidades, incompetencia, y negligencia, por lo que se prohibieron los ensayos de terapia génica (67). Aunque los diagnósticos genéticos humanos experimentaron un notable renacimiento, la moratoria afectó a proyectos que pretendieran una

alteración deliberada de los genes (o “reescribir el genoma”).



**Figura 18. Jesse Gelsinger.**

Casi dos décadas después de la muerte de Gelsinger, se habían reemplazado las tecnologías empleadas con anterioridad, se seleccionaban con todo rigor los nuevos virus utilizados para transferir genes a las células humanas, y se controlaba todo el proceso. El año 2014 se realizó con éxito el **tratamiento por ingeniería genética** de 10 pacientes con **hemofilia B severa** introduciendo el **gen que expresa el factor de coagulación IX** (68). Aunque la inyección del virus portador del gen solo aumentó un 5 % la concentración del factor IX, los pacientes

experimentaron una reducción de los episodios hemorrágicos de un 90 %, y el efecto persistió durante tres años.

#### 4.4. Terapia génica en la línea germinal

Para que la ingeniería genética tenga un efecto permanente se requiere alterar el genoma de las **células ES**, pero los experimentos con células ES humanas fracasaron hasta finales de los años noventa, quizás por su mala calidad o porque las condiciones para su crecimiento no eran apropiadas. El embriólogo **James Thomson**, tras experimentar con células extraídas de embriones de macaco Rhesus que dejaba crecer en placas Petri con otras células que aportaban factores de crecimiento, obtuvo el permiso para utilizar esta técnica con células ES humanas procedentes de las clínicas de fecundación *in vitro*. En **1998** logró **cultivar** por primera vez **células ES humanas** que, implantadas en ratones, eran capaces de generar las tres capas del embrión humano (69) y de fabricar prácticamente todos los tejidos, pero no eran eficientes en la fabricación de espermatozoides y óvulos, por lo que no podían transmitir un cambio genético a la siguiente generación. Inmediatamente, numerosos grupos de investigación empezaron a extraer decenas de líneas de células madre humanas de tejidos fetales con la esperanza de descubrir una capaz de transmitir genes en la línea germinal, pero no lo consiguieron. El año 2001 el Presidente G. W. Bush restringió esta línea de investigación al estudio con las líneas celulares que se habían creado previamente (70). Estas limitaciones no impidieron el desarrollo de un método para introducir modificaciones deliberadas y permanentes en el genoma humano mediante la tecnología CRISPR.Cas9. Por otra parte, el año 2014, embriólogos de Cambridge y del Instituto Weizmann de Israel desarrollaron un sistema para producir células germinales precursoras de espermatozoides y óvulos a partir de células madre embrionarias (71).

#### 4.5. Terapia génica del cáncer

La ingeniería genética se ha utilizado en múltiples aproximaciones para el tratamiento del cáncer, de las que aquí solo vamos a comentar algunas (72). **Los virus son los vectores de genes más comúnmente empleados**, a pesar de que promueven una respuesta inmunológica. Entre los **vectores no virales** los transposones (secuencias móviles de ADN) pueden evitar el uso de los virus. Los liposomas catiónicos sintéticos, son más seguros que los virus pero menos eficientes, por lo que se necesitan cantidades demasiado grandes para su uso clínico.

Hacia finales de los años 1800, los médicos observaron que en algunos pacientes con cáncer, éste remitía al menos temporalmente tras una infección vírica. Según la *NCI Conference on Microbial-Based Cancer Therapy*, celebrada en Bethesda en Julio de 2017, a día de hoy se están estudiando como posibles tratamientos del cáncer varias docenas de virus y algunas bacterias. Los primeros tratamientos para tratar el cáncer a través de la infección provocada por **virus oncolíticos** (llamados así porque

tienden a infectar y matar células tumorales) se realizaron hacia la mitad del siglo veinte. Como no se disponía de técnicas precisas para modificarlos, estos tratamientos produjeron gran morbilidad y mortalidad, siendo frecuente la anulación de su efecto por la muerte de los virus que provocaba el sistema inmune. En la actualidad, la terapia viral es posible utilizando virus oncolíticos o vectores virales en los que se han modificado alguno de sus genes, se han insertado genes extraños, y/o se ha eliminado, modificado o reemplazado su cubierta, a fin de que se reproduzcan eficazmente en las células cancerosas sin dañar a las sanas (73). Cuando se internalizan dentro de las células, el contenido de estos virus manipulados por ingeniería genética se libera en el citoplasma, entra en el núcleo a través de un poro nuclear, y tiene lugar la expresión transgénica.

Uno de los primeros virus oncolíticos utilizados en la terapia del cáncer fue Oncorina<sup>®</sup>, comercializado en China en 2006 (74). Es un adenovirus recombinante que contiene el gen *p53* y produce el correspondiente **factor de transcripción oncosupresor**, que activa genes que paralizan el ciclo celular o disparan el mecanismo de apoptosis. Este virus se ha manipulado para que en las células normales, con un gen *p53* funcional, los virus no puedan multiplicarse, mientras que en una célula deficiente en *p53* (cancerosa) sobrevivan y se multipliquen produciendo la destrucción selectiva de las células. Además de este ejemplo, se han evaluado en ensayos clínicos un gran número de virus, pero solo ha sido aprobado por la *Food and Drug Administration* (FDA) Talimogene laherparepvec (T-VEC, Imlygic<sup>®</sup>), un virus oncolítico modificado de un virus herpes para tratar el melanoma en sus manifestaciones más graves. En éste se han eliminado los genes ICP34.5 y ICP47 con el objetivo de reducir su patogenicidad y aumentar la capacidad de respuesta del sistema inmune del hospedador, y se ha introducido el gen humano GM-CSF para aumentar la respuesta inmune de los linfocitos hacia las células tumorales (75). A partir de 2005, prevalece la idea de que el verdadero valor de los microbios en la terapia del cáncer se debe a su interacción con el sistema inmune, de forma que **los virus se consideran una forma de inmunoterapia**. Cuando un virus infecta a una célula tumoral, se multiplica hasta que la célula explota y libera antígenos tumorales que permiten que el cáncer sea “reconocido” por el sistema inmune.

**Los virus** que infectan selectivamente las células cancerosas pueden modificarse también para actuar **como vectores de un gen que codifique una enzima capaz de activar un profármaco antitumoral** y administrarse conjuntamente con éste. Esta transferencia genética se denomina **virus-directed enzyme prodrug therapy (VDEPT)**. El virus modificado llamado Sitimagene ceradenovec (Cerepro<sup>®</sup>) se llegó a administrar conjuntamente con ganciclovir para el tratamiento del glioblastoma multiforme, aunque se retiró posteriormente. Cerepro<sup>®</sup> utilizó el adenovirus Ad5 como vector para introducir el gen que induce a las células tumorales a

expresar la enzima timidina cinasa (TK) del virus *herpes simplex*, que activa el ganciclovir transformándolo en su trifosfato. Éste se incorpora al ADN de la célula tumoral

pero, al carecer del grupo 3'-OH, la cadena no puede proseguir su síntesis y se produce la muerte celular (Figura 19) (76).

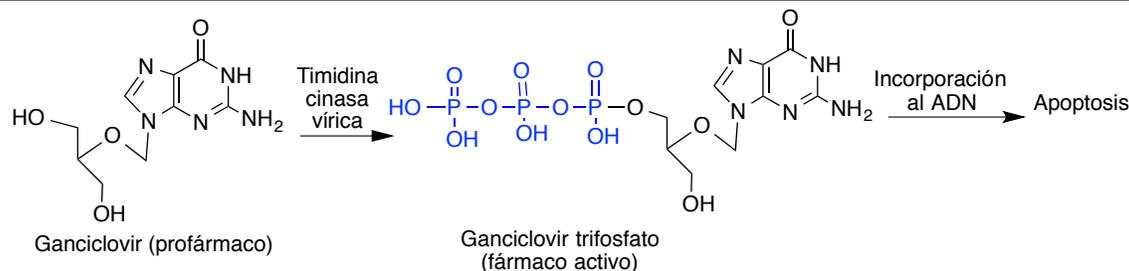


Figura 19. Activación de ganciclovir por timidina cinasa vírica.

En la **terapia génica inmunomoduladora** se modifican genéticamente *ex vivo* células implicadas en el sistema inmune. A dichas células extraídas del tumor se transfieren genes inmunomoduladores utilizando un vector viral que los contiene para que, una vez reimplantadas en el paciente, produzcan citocinas (los agentes responsables de la comunicación intercelular) sin la toxicidad asociada a su administración sistémica. Alternativamente, **pueden modificarse genéticamente células T para que expresen receptores de antígeno artificiales** (quiméricos) asociados a tumores. Por ejemplo, cuando las células T de pacientes con leucemia linfocítica crónica (CLL) se tradujeron con un vector viral que codifica el receptor de antígeno quimérico anti-CD19, se expandieron *ex vivo*, y se infundieron en los pacientes, se observó una rápida respuesta antitumoral (77). Algunos **tratamientos para el cáncer de próstata basados en la terapia génica inmunomoduladora** han llegado a fases avanzadas de ensayos clínicos. Uno de ellos fue rilimogene galvacirepvec (Prostvac<sup>®</sup>), que implicaba el uso para una vacunación primaria de un vector recombinante vaccinia seguida de vacunas de refuerzo empleando un vector

recombinante de viruela aviar. Estos vectores contienen genes para expresar el antígeno prostático específico (PSA) y numerosas moléculas coestimuladoras de las células T. Cuando estas vacunas infectan a las células presentadoras de antígeno (APCs en inglés) generan proteínas que se expresan en su superficie induciendo la interacción de estas APCs con las células T y la consiguiente repuesta inmune, que supone la destrucción de la célula tumoral (78).

También se puede bloquear la expresión de oncogenes (como *Ras* o *Myc*) con **oligonucleótidos antisentido** (ASOs en inglés), que son hebras cortas de “ácido nucleico” sintético (generalmente modificado) con secuencias complementarias a las de las hebras de un ARNm diana. Como los ribosomas no pueden traducir RNAs de doble hebra, la traducción de un ARNm concreto puede inhibirse por un fragmento de su secuencia complementaria, por lo que la terapia con ASOs es una forma de prevenir las enfermedades en las que está involucrada una determinada proteína, no solamente el cáncer (Figura 20) (79).

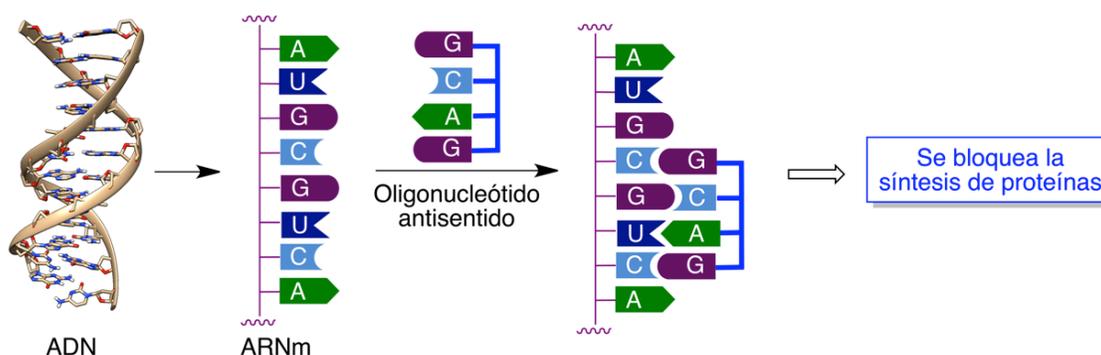


Figura 20. Mecanismo de acción de los oligonucleótidos antisentido.

Hasta ahora no se ha aprobado ningún ASO para el tratamiento del cáncer, aunque hay muchos datos preclínicos y algunos estudios clínicos de algunos de ellos. La elección acertada del vector y del gen diana son decisivas, pero hay que evitar también la toxicidad y los efectos sobre otras posibles dianas (80).

4.6. Medicina genómica (medicina de precisión o

medicina personalizada)

La secuenciación del genoma humano ha propiciado la aparición de la **medicina genómica**, también llamada medicina de precisión o medicina personalizada, que pretende la **adaptación del tratamiento médico (generalmente oncológico) a las características individuales de cada paciente**. Las decisiones referentes al tratamiento o la prevención del cáncer se deberían tomar

en base a la integración de las características genómicas y moleculares del tumor y a la información sobre la situación clínica y los hábitos del paciente. Este planteamiento requiere el conocimiento de las **alteraciones genéticas y moleculares que producen el desarrollo de tumores y de sus metástasis**, el conocimiento del **desarrollo de fármacos que actúen a nivel de dichas alteraciones**, y la **creación de nuevo conocimiento** mediante el análisis de **Big Data** (almacenamiento en red de grandes volúmenes de datos relevantes de los pacientes). En definitiva, **el oncólogo médico** no debería focalizarse exclusivamente en su labor asistencial sino que debería ser también un **investigador**.

Se espera que en los próximos años, se tendrá información relevante sobre el impacto de la medicina guiada por alteraciones genómicas en la supervivencia y los costes asociados al uso de estas técnicas y tratamientos. La medicina personalizada está transformando desde un punto de vista conceptual y metodológico la investigación clínica y biomédica y la asistencia sanitaria.

## 5. EDICIÓN GENÓMICA

La edición genómica, o cambio de secuencias de ADN que codifican una serie de mensajes e instrucciones, implica insertar un corte o ruptura en el ADN, engañar a los mecanismos naturales para evitar su reparación, e introducir los cambios que se deseen.

### 5.1. La tecnología CRISPR.Cas9

Las bacterias y las arqueas, microorganismos unicelulares sin núcleo y en general sin orgánulos membranosos internos, han ido incorporando a su ADN como mecanismo de defensa ciertas secuencias repetidas de nucleótidos procedentes del material genético de los virus que las han atacado con anterioridad. El año 2007 **Philippe Horvath y Rodolphe Barrangou**, dos ingenieros que trabajaban en la fábrica de yogures Danisco France SARL (subsidiaria de DuPont Nutrition Biosciences), observaron que las bacterias *Streptococcus thermophilus*, que transforman los azúcares de la leche en ácido láctico y se utilizan en la fabricación de quesos y yogures, incorporaban a su ADN espaciadores con una secuencia idéntica a partes del genoma de los virus invasores. Para confirmar este hallazgo, alteraron la resistencia de las bacterias frente a los virus manipulando los espaciadores por eliminación o adición de nuevas secuencias de ADN viral, demostrando el papel de este fenómeno en la regulación de la inmunidad bacteriana (81). Varios años antes, el microbiólogo español **Francisco Martínez Mojica** había descubierto en la arquea *Haloferax mediterranei*, responsable de que las salinas de Santa Pola adquieran un color rosáceo cuando crece la concentración de sal, unas secuencias de ADN repetidas a las que

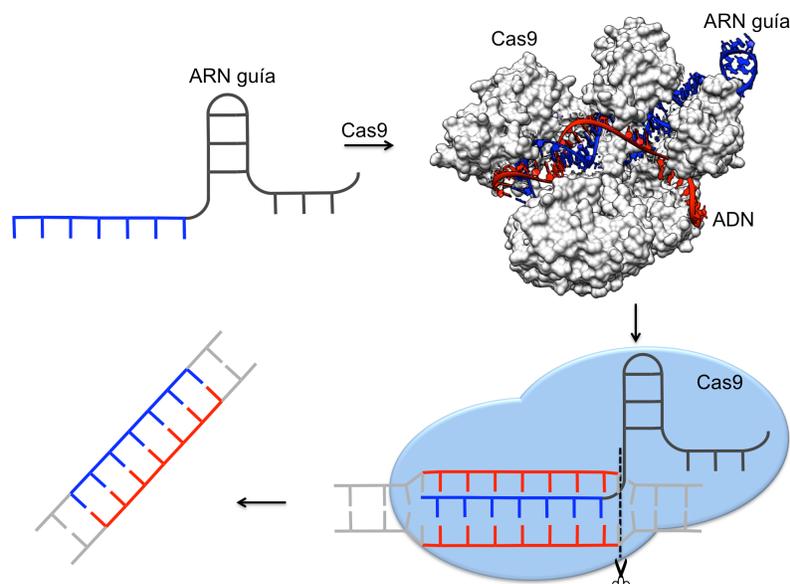
denominó **“repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas” (CRISPR, acrónimo de clustered regularly interspaced short palindromic repeats)**. En estos estudios pioneros, Mojica sugirió que estas secuencias deberían tener un papel en los mecanismos de inmunidad de las células procariontas (82), pero no pudo imaginar que este descubrimiento resultaría útil para la edición de genomas mediante las herramientas CRISPR/Cas9 desarrolladas más tarde por Emmanuelle Charpentier, Jennifer Doudna, y otros investigadores (Figura 21).



Figura 21. Francisco Mojica.

### 5.2. Mecanismo de acción del sistema CRISPR/Cas9

En la naturaleza, las repeticiones palindrómicas actúan como una plantilla cuando el virus ataca de nuevo y permiten que la bacteria produzca una secuencia complementaria de ARN monocatenario denominado **ARN Crispr** (o “ARNcr”). Éste es un **“buscador”** capaz de encontrar y reconocer el ADN del virus invasor por ser una imagen especular de los tramos de su ADN incorporados previamente en el ADN bacteriano. El mecanismo de defensa se completa con la **proteína Cas9**, una **endonucleasa del grupo de las proteínas Cas** (“asociadas a Crispr”), que actúa como un par de tijeras moleculares cortando y destruyendo el ADN de los invasores. Cas9 se une a ARNcr y a otro ARN denominado **ARNtracr** (“ARNcr trans-activado”), y ambos dirigen a la enzima al sitio de destino, donde Cas9 corta ambas cadenas de la doble hélice de ADN usando dos regiones separadas o “dominios” de su estructura y produciendo lo que se conoce como una **“ruptura de doble hebra”**. Además de los componentes mencionados, existen unas **secuencias** de ADN cortas conocidas como **PAM** (“motivo adyacente de protoespaciador”) que se sitúan adyacentes a la secuencia de ADN que ha de cortarse y sirven como marcas para asegurar que Cas9 no corte en cualquier parte de un genoma. Si el complejo Cas9 no ve un PAM junto a su secuencia de ADN objetivo, no cortará (Figura 22).



**Figura 22. Mecanismo de corte y pega de CRISPR/Cas9.** (a) Se genera un ARN guía que corresponde al ADN que se desea modificar. (b) Esta secuencia se incorpora a una célula, junto con la proteína Cas9. El ARN guía se dirige a la secuencia de ADN complementaria de la suya y Cas9 actúa como nucleasa. (c) El ARN guía se separa, y queda la pieza de ADN modificada.

### 5.3. CRISPR-Cas9 como una herramienta de edición genómica

En los años 2011 y 2012, **Emmanuelle Charpentier** y **Jennifer Doudna** se dieron cuenta de que el sistema podría reprogramarse sustituyendo el elemento de reconocimiento. Cambiando el “buscador”, las bacterias buscarían y cortarían un gen seleccionado, mutándolo a voluntad. El sistema CRISPR-Cas9 bacteriano podría utilizarse para cortar cualquier región del ADN cambiando la secuencia de nucleótidos del ARNcr que se une a la secuencia de ADN objetivo del corte, transformándose así en una herramienta simple y programable de edición del genoma. El año 2012 se publicaron dos artículos fundamentales en las revistas *Science* y *PNAS*. En el estudio publicado en *Science*, **Charpentier, Doudna, Martin Jinek** y sus colegas identificaron una familia de endonucleasas y simplificaron aún más el sistema fusionando ARNcr y ARNtracr para crear un ARN quimera capaz de dirigirse a una secuencia específica de ADN. De esta forma, la edición del genoma requiere sólo dos componentes: un ARN guía y la proteína Cas9 (83). En la publicación de *PNAS* se describieron tres sistemas CRISPR, los tipos I y III en los que los complejos que silencian a los ácidos nucleicos extraños están formados por grandes agregados, y el tipo II en el que el complejo silenciador está compuesto de una sola proteína (Cas9) que se enlaza al ARNcr (84). Posteriormente se ha sabido que combinando la proteína Cas9 con un RNA exógeno es posible la manipulación (o “edición”) de los genes de organismos más complejos (85). Cuando se corta un gen quedan dos cabos de ADN sueltos y se intenta recuperar la información perdida copiando la otra copia de reserva del gen presente en la célula. Sin embargo, si ésta se inunda de un ADN extraño (el que se desea insertar) el sistema de reparación copia la información de éste en vez de la

contenida en la copia de reserva. Se ha borrado una palabra (por ejemplo, el gen mutante de la fibrosis quística) y se ha sustituido por otra (la versión normal del gen), de ahí el nombre de “edición genómica”. El trabajo de Charpentier y Doudna fue reconocido en España con el Premio Princesa de Asturias de Investigación Científica y Técnica del año 2015 (Figura 23).



**Figura 23. Jennifer Doudna y Emmanuelle Charpentier.**

### 5.4. Utilidad y limitaciones

La tecnología CRISPR-Cas9 se ha popularizado en los últimos años porque es fácil de usar y aproximadamente cuatro veces más eficiente que el uso de otras herramientas disponibles con anterioridad como las **nucleasas TALENs** (*transcription activator-like effector nucleases*) (86). Para evitar que los cortes se efectúen en los genes equivocados o que la reparación no sea eficaz dificultando que se “reescriba” en los sitios adecuados del genoma, la tecnología CRISPR se sigue perfeccionando. Se ha aplicado en agricultura para mejorar el rendimiento, resistencia a enfermedades, tolerancia a la sequía, eliminación de la resistencia a los herbicidas o pesticidas y optimización de las propiedades nutricionales de los cultivos (87). Muchos opinan que los cultivos modificados

genéticamente mediante CRISPR llegarán al mercado en cinco años.

Los estudios realizados *in vitro* o con animales modelo de enfermedades humanas (fibrosis quística, cataratas o anemia de Fanconi, entre otras) han demostrado que esta tecnología puede ser eficaz para corregir defectos genéticos, y han allanado el camino para su aplicación terapéutica en seres humanos, aunque si se introduce artificialmente un gen en una línea germinal humana, el embrión resultante sería obligatoriamente portador del cambio genético en todas sus células, incluidos espermatozoides y óvulos.

En 2015, científicos chinos editaron genéticamente embriones humanos no viables por ser triplonucleares (3PN) con la tecnología CRISPR. Se intentaba corregir el gen responsable de la  **$\beta$ -talasemia**, un trastorno sanguíneo que puede producir una anemia severa y ser potencialmente mortal. CRISPR/Cas9 pudo romper eficazmente el gen de la  $\beta$ -globina endógena (HBB), pero la eficiencia del mecanismo de reparación HDR (*homologous recombination directed repair*) fue baja y se obtuvieron embriones en mosaico en los que existen líneas celulares con diferente dotación cromosómica. El investigador principal era **Junjui Huang**, conocido por haber protagonizado en 2006 uno de los mayores fraudes de la historia de la ciencia moderna. Hwang había tenido que retirar entonces dos estudios de *Science* en los que aseguraba haber usado la técnica de la oveja Dolly para clonar embriones humanos, por lo que fue expulsado de su puesto en la Universidad Nacional de Seúl y acusado de

varios cargos, como malgastar fondos de investigación o violar leyes éticas. En el trabajo que realizó en 2015 para corregir el gen responsable de la  **$\beta$ -talasemia** observó que en un tercio de los embriones se habían introducido mutaciones no deliberadas en otros genes que eran esenciales para su supervivencia. A pesar de estas advertencias, su publicación fue rechazada por consideraciones éticas en las revistas *Science*, *Nature* y *Cell*. Finalmente, el trabajo se publicó en una revista de libre acceso y poca relevancia (*Protein & Cell*) (88).

En occidente se afirma que es necesaria una moratoria para seguir experimentando con embriones humanos, pero al parecer los chinos no tienen ese rechazo. De hecho, un equipo de científicos de la Universidad Médica de Cantón anunció en 2016 que había conseguido **embriones humanos resistentes al VIH** (el virus causante del sida). Utilizando 26 embriones "con taras y no aptos para tratamientos de fertilidad" (en palabras **Fan Yong** el investigador principal), lograron que cuatro de ellos desarrollaran inmunidad frente al VIH, aunque el resto mostraron mutaciones "no planificadas" (89).

El 3 de mayo de 2017 se publicaba en el periódico "El País" el siguiente titular: "Científicos de varios países corrigen una enfermedad hereditaria en embriones humanos. La técnica CRISPR elimina la causa genética de la muerte súbita." Se trataba de experimentos realizados en EEUU, Corea del Sur y China por varios científicos entre los que destacaban **Juan Carlos Izpisúa** (investigador del Instituto Salk), **Shoukhrat Mitalipov** y **Jin-Soo Kim** (Figura 24).



Figura 24. De izquierda a derecha, Juan Carlos Izpisúa, Shoukhrat Mitalipov y Jin-Soo Kim.

Este grupo había eliminado en embriones la **miocardiopatía hipertrófica**, una enfermedad del corazón hereditaria que provoca muerte súbita en deportistas y personas jóvenes (90). Una de las causas que la provocan es que una de las dos copias del **gen MYBPC3** es errónea. Este gen codifica a la proteína C, que se enlaza a la miosina del músculo cardíaco para dar el complejo **MyBP-C** y éste se asocia a la estructura del sarcómero (la unidad funcional del músculo estriado en la contracción muscular). La reedición de este gen mutado se realizó en espermatozoides de un hombre portador de la enfermedad utilizando la técnica CRISPR, inyectando al mismo tiempo en óvulos donados por mujeres sanas, los espermatozoides

del portador y un conjunto formado por el ARN buscador, Cas9 y la versión correcta del gen. De los 58 embriones resultantes, 42 se desarrollaron sin la mutación que causa la enfermedad, lo que supone una tasa de éxito del 72 %. Por primera vez se había logrado que un número sustancial de embriones fueran totalmente viables, sin errores genéticos adicionales (aunque fueron destruidos algunos días después de la investigación).

La clave de este éxito radica según los autores en que los componentes de CRISPR/Cas9 se inyectaron junto al esperma en el óvulo, y no después cuando ya se ha formado un embrión, como se había hecho previamente en otros laboratorios. En este caso resultó sorprendente que,

una vez cortado el genoma, los mecanismos naturales de reparación de los óvulos no usaron la versión correcta del gen introducida en el experimento, sino que duplicaron la propia copia correcta del gen que ya llevaban en su genoma. Este fenómeno, que no se había observado antes ni en animales de laboratorio ni en las células somáticas humanas, apunta a que las células reproductoras tienen un mecanismo único y muy robusto que tiene sentido desde el punto de vista evolutivo puesto que los óvulos son las células encargadas de perpetuar la especie. Lo que todavía no se sabe es si este fenómeno impedirá corregir con esta técnica defectos genéticos que estén en el óvulo en vez de en el espermatozoide.

El logro que comentamos es “sorprendente y preocupante a la vez”, señala **Lluís Montoliu**, miembro del comité de bioética del Consejo Superior de Investigaciones Científicas: “Son unos resultados muy convincentes y demuestran que para reparar un gen no hace falta ni siquiera un factor exógeno, el propio óvulo lo repara”, añade. “Lo preocupante es que esta investigación también contraviene el Protocolo de Oviedo”, un pacto europeo sobre medicina y biología firmado por 29 países, incluida España, y en el que no están EE UU, China ni Reino Unido”. Montoliu también advierte de que la aplicación de esta técnica en gametos solo sería útil en un reducidísimo número de casos. En el resto, el diagnóstico preimplantacional permitiría identificar y descartar los embriones con defectos genéticos. Lo realmente importante parece ser la futura aplicación a las células somáticas.

Idealmente, la técnica CRISPR podría permitir que la enfermedad desapareciera progresivamente, pero también desaparecería la identidad. El venezolano **José Luis Cordeiro** y **David W. Wood** (un matemático de Cambridge cofundador del sistema operativo Symbian), en su libro “La muerte de la muerte” (91), defienden que “La muerte será opcional en el año 2045 y el envejecimiento una enfermedad curable”. En su opinión, esto será posible gracias a varias tecnologías como la edición genética, la medicina regenerativa, la eliminación de las células muertas del cuerpo, los tratamientos con células madre, la reparación de las células dañadas y la impresión de órganos en 3D. ¿No resulta asustante, además de altamente imaginativo?

### 5.5. Genética dirigida.

El año 2014, **Kevin M. Esvelt** y colaboradores en la Universidad de Harvard indicaron que la tecnología CRISPR podría combinarse con un fenómeno natural conocido como **genética dirigida**, para alterar el destino genético de una especie. Algunos alelos han evolucionado y adoptado mecanismos moleculares que les confieren una posibilidad de transmisión mayor del 50 % (que es lo normal), lo que les confiere propiedades de genética dirigida. También se han desarrollado módulos genéticos sintéticos con propiedades similares. Estos “*gene drivers*”, son **genes “egoístas”** dominantes que se extienden rápidamente en la población y aumentan la probabilidad de que un rasgo concreto pase desde un progenitor a la

descendencia. La genética dirigida podría utilizarse por ejemplo para evitar la resistencia a los pesticidas y para ayudar a controlar la propagación de enfermedades como el paludismo induciendo la esterilidad en el vector de la enfermedad (las hembras del mosquito *Anopheles gambiae*) (92). Ciertos genes que impiden multiplicarse al parásito de la malaria se harían con el tiempo más comunes y se extenderían a toda la población.

**La genética dirigida** se ha propuesto también como técnica para cambiar las poblaciones salvajes, por ejemplo para combatir insectos que transmiten enfermedades (en particular mosquitos en los casos de malaria, dengue y zika) o para controlar especies invasoras, salvando de la extinción a la fauna autóctona de un ecosistema aislado implantando un gen que reduzca la fertilidad de los organismos invasores (93). Sin embargo, **es una manera de sesgar o predisponer una herencia de genes artificialmente**, por lo que su liberación en la naturaleza tiene un impacto potencialmente enorme y levanta importantes preocupaciones bioéticas. **Kenneth Akito Oye** y sus colegas señalan el posible impacto ecológico del uso del *gene drive* (94), porque podría reducir la diversidad genética de las poblaciones y un rasgo introducido podría extenderse más allá de la población objetivo a otros organismos a través de cruzamientos (95).

**La edición de la línea germinal puede acarrear consecuencias no deseadas para las futuras generaciones** porque hay todavía mucho desconocimiento en la comunidad científica (96). Otras preocupaciones éticas son de carácter general: ¿Se deben hacer cambios que podrían afectar a generaciones futuras sin tener su consentimiento? ¿Qué pasa si el uso de la edición de la línea germinal cambia de ser una herramienta terapéutica a una herramienta de mejora para diversas características humanas?

Para abordar estas preocupaciones, las Academias Nacionales de Ciencias, Ingeniería y Medicina de Estados Unidos han elaborado un informe completo con directrices y recomendaciones para la edición del genoma. **Izpisúa** ha sido uno de los miembros de este panel internacional, que publicó un documento a principios del 2018 señalando qué usos de CRISPR deben ser permitidos. La tecnología, decían, debe usarse solo en los casos en los que sea el último recurso para evitar enfermedades graves y nunca para intentar mejorar las capacidades físicas o mentales de un individuo, algo que, para Izpisúa, ni siquiera sería posible desde el punto de vista técnico hoy por hoy. En este documento instan a la prudencia en la búsqueda de la edición de la línea germinal, pero enfatizan que “la precaución no significa prohibición”.

Esta investigación no habría sido posible en España porque la ley prohíbe expresamente crear embriones para investigación y solo se pueden usar aquellos que sean descartados en las clínicas de reproducción asistida.

## 6. AGRADECIMIENTOS

La autora está en deuda con varios científicos que han sido descubridores o transmisores de los avances que se

comentan en esta breve revisión, muy particularmente con Siddhartha Mukherjee y Francis S. Collins por sus libros “The gene: An intimate history” (1) y “The Language of God” (97), respectivamente. También agradece la elaboración de algunas figuras por el Dr. J. C. Menéndez.

## 7. REFERENCIAS

- Siddhartha Mukherjee. “The gene: An intimate history”. Ed. Scribner, New York, 2016.
- Sesión del jueves 22 de marzo de 2018: “Modificación genética humana: una perspectiva tecnológica y ética”, a cargo de los Dres. C. Nombela y R. Sentandreu.
- Esta situación ha sido reflejada en clave de comedia por el dramaturgo Fernando Arrabal en un reciente artículo del periódico ABC: Fernando Arrabal. “Las olvidadas”. ABC, 21 de Marzo de 2018.
- Dobzhansky T. Nothing in Biology Makes Sense except in the Light of Evolution. The American Biology Teacher 1973; 35: 125-9.
- Greaves M, Maley CC. Clonal evolution in cancer. Nature 2012; 481: 306-13.
- Dalton F. “Essays in Eugenics”. Ed. Macmillan, 1909.
- Avendaño C. Biological relevance of a mysterious hydroxyl group. Anales RANF 2016; 82: 274-82.
- Berta P, Hawkins JR, Sinclair AH, Taylor A, Griffiths BL, Goodfellow PN, Fellous M. Genetic evidence equating SRY and the testis-determining factor. Nature, 1990; 348: 448-50.
- Hamer DH, Hu S, Magnuson VL, Hu N, Pattatucci AM. A linkage between DNA markers on the X chromosome and male sexual orientation. Science 1993; 261: 321-7.
- Morgan TH, Sturtevant AH, Muller HJ, Bridges CB. “The Mechanism of Mendelian Heredity”. Ed. Henri Holt and Company, 1915.
- Avendaño C. Antimicrobial resistance. Some aspects of a big problem. Anales RANF 2017; 83: 380-91.
- Griffith F. The significance of pneumococcal types. Journal of Hygiene, 1928; 27: 113-59.
- Muller HJ. Artificial transmutation of the genes. Science 1927; 22: 84-7.
- Avery OT, MacLeod CM, McCarty M. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. Induction of transformation by a deoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type III. Journal of Experimental Medicine 1944; 79: 137-58.
- Watson JD, Crick FHC. Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. Nature 1953; 171: 737-8.
- Biffi G, Tannahill D, McCafferty J, Balasubramanian S. Quantitative visualization of DNA G-quadruplex structures in human cells. Nature Chemistry 2013; 5: 182-6.
- Phan AT, Mergny JL. Human telomeric DNA: G-quadruplex, i-motif and Watson-Crick double hélix. Nucleic Acids Research 2002; 30: 4618-25.
- Zeraati M, Langley DB, Schofield P, Moye AL, *et al.* I-motif DNA structures are formed in the nuclei of human cells. Nature Chemistry 2018; doi:10.1038/s41557-018-0046-3.
- Beadle G. Genetics and metabolism in Neurospora. Physiological Reviews 1945; 25: 643-63.
- a) Brenner S, Jacob S, Meselson M. An unstable intermediate carrying information from genes to ribosomes for protein synthesis. Nature, 1960; 190: 576-81. b) Gross F, Hiatt H, Gilbert W, Kurland CG, Risebrough RW, Watson JD. Unstable ribonucleic acid revealed by pulse labelling of *Escherichia coli*. Nature, 1960; 190: 581-5. (*Pulse labelling* es una técnica bioquímica para detectar la presencia de una molécula marcando una muestra con radioisótopos).
- Watson JD, Crick FHC. Genetical implications of the structure of deoxyribonucleic acid. Nature, 1953; 171: 965.
- Szathmáry E. The origin of the genetic code: amino acids as cofactors in an RNA world. Trends Genet. 1999; 15: 223-9.
- Dafny-Yelin M, Chung S., Frankman EL, Tzfira T. pSAT RNA interference vectors: a modular series for multiple gene down-regulation in plants. Plant Physiol. 207; 145: 1272-81.
- Ruvkun G. Glimpses of a tiny RNA world. Science, 2001; 294: 797-99.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci 1977; 74: 5463-7.
- Sanger F, Air GM, Barrell BG, Brown NL, *et al.* Nucleotide sequence of bacteriophage ΦX174; Nature 1977; 265: 687-95.
- Maxam A, Gilbert W. A new method for sequencing DNA. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 1977; 74: 560-4.
- a) Hedrick SM, Cohen DI, Nielsen EA, Davis MM. Isolation of cDNA clones encoding T cell-specific membrane-associated proteins. Nature 1984; 308: 149-53. b) Yanagi Y, Yoshikai Y, Leggett K, Clark SP, Aleksander I, Mak TW. A human T cell-specific cDNA clone encodes a protein having extensive homology to immunoglobulin chains, Nature 1984; 308: 145-9.
- Pardue AB, Jacob F, Monod J. The genetic control and cytoplasmic expression of “inducibility” in the synthesis of b-galactosidase by *E. coli*. Journal of Molecular Biology, 1959; 1: 165-78.
- Enzymatic synthesis and breakdown of polynucleotides; polynucleotide phosphorylase. Grunberg-Manago M, Ochoa S. J Am Chem Soc 1955; 77: 3165-6.

31. Salas M, Blanco L, Lázaro JM, de Vega M. The bacteriophage phi29 DNA polymerase. *IUBMB Life*. 2008; 60: 82-5.
32. Jackson DA, Symons RH, Berg P. Biochemical method for inserting new genetic information into DNA of simian virus 40. Circular SV40 DNA molecules containing lambda fage genes and the galactose operon of *Escherischia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 1972; 69: 2904-9.
33. a) Berg P, Baltimore D, Boyer H, Cohen S, *et al*. Potential biohazards of recombinant DNA molecules. *Science*, 1974; 185: 3034. b) Ver también: Palmer JG, Cook-Deegan R., Chapter 17 of “Designing Our Descendants: The Promises and Perils of Genetic Modifications” (Chapman AR, Frankel MS, Ed.). Johns Hopkins University Press, 2003.
34. Cohen SN, Miller CA. Non-chromosomal antibiotic resistance in bacteria. II. Molecular nature of R-factors isolated from *Proteus mirabilis* and *Escherichia coli*. *J Mol Biol*. 1970; 50: 671–87.
35. Cohen SN, ACY, Boyer HW, RB. Construction of Biologically Functional Bacterial Plasmids *In Vitro*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1973; 70: 3240-4.
36. Lin FK, Suggs S, Lin CH, Broune JK, *et al*. Cloning and expression of the human erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985; 92: 7850-84.
37. Jacobs K, Shoemaker C, Rudersdorf R, Neill SD, Kaufman RJ, Mufson A, *et al*. Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of human erythropoietin. *Nature* 1985; 313: 806-10.
38. Vogelstein B, Kinzler KW. The multistep nature of cancer. *Trends in Genetics* 1993; 9: 138-41.
39. Saiki R, Gelfand D, Stoffel S, Scharf S, Higuchi R, Horn G, Mullis K, Erlich H. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988; 239: 487-91.
40. *C. elegans* Sequencing Consortium. Genome Sequence of the Nematode *C. elegans*: A Platform for Investigating Biology. *Science* 1998; 282: 2012-8.
41. Kornberg TB, Krasnow MA. The Drosophila genome sequence: implications for biology and medicine. *Science* 2000; 287: 2.218-20. *Science* 2000; 287: 2.105-364.
42. Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, *et al*. The sequence of the human genome. *Science* 2001; 291: 1304-51.
43. International Human Genoma Sequencing Consortium. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001; 409: 860-921.
44. Parrish NF, Tomonaga K. Endogenized viral sequences in mammals. *Curr Opin Microbiol* 2016; 31: 176-83.
45. a) Lyford GL, Yamagata K, Kaufmann WE, Barnes CA, *et al*. Arc, a growth factor and activity-regulated gene, encodes a novel cytoskeletal-associated protein that is enriched in neuronal dendrites.” *Neuron* 1995; 14: 433-45. b) Link W, Konietzko U, Kauselmann G, Krug M, *et al*. Somatodendritic expression of an immediate early gene is regulated by synaptic activity. *Proc Nat Acad Sci USA* 1995; 92: 1734-8.
46. a) Pastuzyn ED, Day CE, Kearns RB, Kyrke-Smith M, *et al*. The Neuronal Gene Arc Encodes a Repurposed Retrotransposon Gag Protein that Mediates Intercellular mRNA Transfer. *Cell* 2018; 172: 275-88. b) Parrish NF, Tomonaga K. A Viral (Arc)hive for Metazoan Memory. *Cell* 2018; 172: 8-10.
47. Thompson LR, Sanders JG, McDonald D, Amir A, *et al*. The Earth Microbiome Project Consortium. A communal catalogue reveals Earth’s multiscale microbial diversity. *Nature* 2017; 551: 457-63.
48. Lewin HA, Robinson GE, Kress WJ, Baker WJ, *et al*. Earth BioGenome Project: Sequencing life for the future of life. *Proc Natl Acad Sci USA* 2018; DOI: 10.1073/pnas.
49. a) Gurdon JB, Elsdale TR, Fischberg M. Sexually mature individuals of *Xenopus laevis* from the transplantation of single somatic nuclei. *Nature* 1958; 182: 64-5. b) Gurdon JB. The transplantation of nuclei between two species of *Xenopus*. *Developmental Biology* 1962; 6: 68-83.
50. Chow JC, Yen Z, Ziesche SM, Brown CJ. Silencing of the mammalian X chromosome. *Annual Review of Genomics and Human Genetics* 2005; 6: 69-92.
51. Duret L, Chureau C, Samain S, Weissenbach J, Avner P. "The Xist RNA gene evolved in eutherians by pseudogenization of a protein-coding gene". *Science* 2006; 312: 1653-5.
52. Kuo M-H, Brownell JE, Sobel RE, Ranalli TA, *et al*. Transcription-linked acetylation by Gcn5p of histones H3 and H4 at specific lysines, *Nature* 1996; 383: 269-72.
53. Tjio JH, Levan A. The chromosome number of man. *Hereditas* 1956; 42: 1-6.
54. Lejeune J, Gautier M, Turpin R. Etude des chromosomes somatiques de neuf enfants mongoliens. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l’Académie des Sciences (Paris)* 1959; 248: 1721-2.
55. Botstein D, White RL, Skilnick M, Davis RW. Construcion of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorfisms. *American Journal of Human Genetics* 1980; 32: 314-31.
56. Kieburtz K, MacDonald M, Shih C, Feigin A, *et al*. Trinucleotide repeat length and progression of illness in Huntington’s disease. *Journal of Medical Genetics* 1994; 31: 872-4.
57. Tsui LC, Buchwald M, Barker D, Braman JC, *et al*. Cystic fibrosis locus defined by a genetically linked polymorphic DNA marker. *Science* 1985; 230: 1.054-7.
58. Wanda K, Lenma WK, Feldman GL, Kerem BS, *et al*. Mutation analysis for heterocygote detection and the prenatal diagnosis of cystic fibrosis. *New England Journal of Medicine* 1990; 322: 291-6.

59. Hall JM, Lee MK, Newman B, Morrow JE, Anderson LA, Huey B, King MC. Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21. *Science* 1990; 250: 1684-9.
60. Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal PA, *et al.* A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science* 1994; 266: 66-71.
61. Sekar A, Bialas AR, de Rivera H, Davis A, *et al.* Schizophrenia risk from complex variation of complement component 4. *Nature* 2016; 530: 177-83.
62. Handyside AH, Kontogianni EH, Hardy K, Winston RM. Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplifications. *Nature* 1990; 344: 25-6.
63. Jaenich R, Mintz B. Simian virus 40 DNA sequences in DNA of healthy adult mice derived from preimplantation blastocytes injected with viral DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1974; 71: 1.250-4.
64. Thomas KR, Capecchi RM. Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell* 1987; 51: 503-12.
65. a) Wivel NA, Anderson WF. Human gene therapy. Public policy and regulatory issues. *Cold Spring Harbor Monograph Archive* 1999; Chapter 24, n° 36: 671-89. b) Anderson WF. The best of times, the worst of times. *Science* 2000; 288: 627.
66. Booth C, Gaspar HB. Pegademase bovine (PEG-ADA) for the treatment of infants and children with severe combined immunodeficiency (SCID). *Biologics: Targets and Therapy* 2009; 3: 349-58.
67. Lehrman S. Virus treatment questioned after gene therapy death. *Nature* 1999; 401: 517-8.
68. Nathwani AC, Reiss UM, Tuddenham EG, Rosales C, *et al.* Long term safety and efficacy of factor IX gene therapy in hemophilia B. *New England Journal of Medicine* 2014; 371; 1.994-2.004.
69. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, *et al.* Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998; 282: 1145-7.
70. Wertz DW. Embryo and stem cell research in the United States. History and politics. *Gene Therapy* 2002; 9: 674-8.
71. Tang WW, Dietmann S, Irie N, Leitch HG, *et al.* A Unique Gene Regulatory Network Resets the Human Germline Epigenome for Development. *Cell* 2015; 161: 1.453-67.
72. Avendaño C, Menéndez JC. "Gene therapy" en "Medicinal Chemistry of Anticancer Drugs", 2015, Ed. Elsevier, pág. 582 y siguientes.
73. Ferguson MS, Lemoine NR, Wang Y. Systemic Delivery of Oncolytic Viruses: Hopes and Hurdles. *Adv Virol* 2012; 2012: 1-14.
74. Pan J-J, Zhang SW, Chen C-B, Xiao S-W, *et al.* Effect of recombinant adenovirus-p53 combined with radiotherapy on long-term prognosis of advanced nasopharyngeal carcinoma. *J Clin Oncol* 2009; 27: 799-804.
75. Andtbacka RH, Kaufman HL, Collichio F, Amatruda T, *et al.* Talimogene Laherparepvec Improves Durable Response Rate in Patients With Advanced Melanoma. *J Clin Oncol* 2015; 33: 2780-8.
76. Sandmair AM, Loimas S, Puranen P, Immonen A, *et al.* Thymidine kinase gene therapy for human malignant glioma, using replication-deficient retroviruses or adenoviruses. *Hum Gene Ther* 2000; 11: 2197-205.
77. Jin Z, Maiti S, Huls H, Sing H, Olivares S, *et al.* The hyperactive Sleeping Beauty transposase SB100X improves the genetic modification of T cells to express a chimeric antigen receptor. *Gene Ther* 2011; 18: 849-56.
78. Madan RA, Arlen PM, Mohebtash M, Hodge JW, *et al.* Prostavac-VF: a vector-based vaccine targeting PSA in prostate cancer. *Expert Opin Invest Drugs* 2009; 18: 1001-11.
79. Khuri FR, Kurie JM. Antisense approaches enter the clinic. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 1607-13.
80. Moreno PM, Pego AP. Therapeutic antisense oligonucleotides against cancer: hurdling to the clinic. *Front Chem* 2014; 2: 87.
81. Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, *et al.* CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science* 2007; 23; 315: 1709-12.
82. a) Mojica FJ, Juez G, Rodríguez-Valera F. Transcription at different salinities of *Haloferax mediterranei* sequences adjacent to partially modified PstI sites. *Mol Microbiol* 1993; 9: 613-21. b) 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; 60:174-82.
83. 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.
84. Gasiunas G, Barrangou R, Horvath Ph, Siksnys V. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *PNAS* 2012 ; 109: 15539-40.
85. Sander JD, Joung JK. CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nature Biotechnology* 2014; 32: 347-55.
86. Nakade S, Tsubota T, Sakane Y, Kume S, *et al.* Microhomology-mediated end-joining-dependent integration of donor DNA in cells and animals using TALENs and CRISPR/Cas9. *Nature Communications* 2014; 5: 5560.
87. McCarthy J. 10 ways CRISPR (gene-editing) can fight poverty. *Global Citizen*, 27 Nov. 2015.

88. a) Liang P, Xu Y, Zhang X, Ding Ch, *et al.* CRISPR/Cas9-mediated editing in human tripronuclear zygotes. *Protein & Cell* 2015; 6: 1-10. b) Ver la noticia en *Nature News*, 22 de abril 2015: Cyranoski D, Reaedon S. “Chinese scientists genetically modify human embryos”.
89. Kang X, He W, Huang Y, Yu Q, *et al.* Introducing precise genetic modifications into human 3PN embryos by CRISPR/Cas-mediated genome editing. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 2016; 33: 581-8.
90. Ma H, Marti-Gutierrez N, Park S-W, Wu J, *et al.* Correction of a pathogenic gene mutation in human embryos. *Nature* 2017; 548: 413-9.
91. Cordeiro JL, Wood DW. “La muerte de la muerte”. Editorial Deusto 2017.
92. Hammond A, Galizi R, Kyrou K, Simoni A, *et al.* A CRISPR-Cas9 gene drive system targeting female reproduction in the malaria mosquito vector *Anopheles gambiae*. *Nature Biotechnology* 2016; 34: 78-83.
93. Leitschuh CM, Kanavy D, Backus GA, Valdez RX, Serr M, Pitts EA, Threadgill D, Godwin J. Developing Gene Drive Technologies to Eradicate Invasive Rodents From Islands, 2018; *Journal of Responsible Innovation* 5 (S1): S13–S39.
94. Oye KA, Esvelt K, Appleton E, Catterucci F, *et al.* Regulating gene drives. *Science* 2014; 345: 626-8.
95. Esvelt KM, Gemmell NJ. Conservation demands safe gene drive. *PLOS Biology* 2017; <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2003850>.
96. Baltimore D, Berg P, Botchan M, Carroll D, *et al.* A prudent path forward for genomic engineering and germline gene modification. *Science* 2015; 348: 36-8.
97. Collins FS. “The Language of God”. Free Press, New York, London, Toronto Sydney, 2006.