



**HISTORIA “NOBELADA” DE LA
GENÉTICA (1900-2016):
CONCEPTO Y MÉTODO
SEGUNDA ADDENDA**

Juan-Ramón Lacadena

Madrid, 2016

MONOGRAFÍA XLIV

© Juan Ramón Lacadena Calero

Editor: Antonio L. Doadrio

Edita: Real Academia Nacional de Farmacia. Farmacia11. Madrid, Spain.

ISBN: **978-84-946424-2-5**

Imagen de la portada: Mapa de potencial electrostático del ADN. A.L. Doadrio. Spartan Student Software.

A Isabel,
que me ha acompañado
desde el principio hasta
el final de mi dedicación
vocacional a la Genética.

A todos los colaboradores
que he tenido a lo largo
de mi vida académica,
docente e investigadora.

Este libro se acabó de imprimir el 26/12/2016

©REAL ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA

Todos los derechos reservados



HISTORIA “NOBELADA” DE LA
GENÉTICA (1900-2016):
CONCEPTO Y MÉTODO
SEGUNDA ADDENDA

Juan-Ramón Lacadena

Profesor Emérito de la Universidad Complutense

Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN	8
1.1.	Historia “nobelada” de la Genética: Concepto y método.....	8
2.	EL CONCEPTO DE GENÉTICA.....	11
3.	LA APORTACIÓN DE LOS PREMIOS NOBEL AL CONTENIDO FORMAL DE LA GENÉTICA	15
3.1.	¿Qué son los genes?.....	17
3.2.	¿Cómo se organizan y transmiten los genes?	21
3.3.	¿Cómo y cuándo se expresan los genes?.....	34
3.4.	¿Cómo cambian los genes?.....	87
3.5.	¿Cuál es el destino de los genes?	98
4.	EL MÉTODO CIENTÍFICO EN GENÉTICA Y LOS PREMIOS NOBEL	101
4.1.	La pregunta	101
4.2.	El material biológico.....	101
4.3.	La técnica	104
5.	ÁREAS ESPECÍFICAS DE INVESTIGACIÓN EN GENÉTICA Y LOS PREMIOS NOBEL	119
5.1.	El material hereditario	120
5.2.	Inmunogenética.....	120
5.3.	Genética y Cáncer	132
5.4.	Genética del desarrollo.....	136
5.5.	Genética aplicada a la Mejora de Plantas	144
5.6.	Haciendo predicciones	146
6.	HEREJÍAS GENÉTICAS Y LOS PREMIOS NOBEL.....	148
7.	EPÍLOGO.....	150
8.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	154
	Cuadro 1.1	186
	Cuadro 1.2	190

Cuadro 1.3	194
Cuadro 4.1	198



1. INTRODUCCIÓN

La palabra “Genética” fue usada por primera vez por William Bateson en una carta escrita el 18 de abril de 1905 a Adam Sedgwick y propuesta al año siguiente por el propio Bateson en la “Conference on Hybridization and Plant Breeding”, que tuvo lugar en Londres, para denominar oficialmente a la nueva ciencia que explica la “herencia y la variación en los seres vivos”. De hecho, las actas de aquella reunión pasaron a denominarse “Report of the Third International Conference on Genetics”.

Junto a este planteamiento de la Genética se puede añadir el concepto de Genética como “la ciencia que estudia el material hereditario bajo cualquier nivel o dimensión” (Rubio, 1973; Lacadena, 1974). En otras palabras, la Genética estudia los genes, tratando de responder las siguientes preguntas: ¿qué son los genes? ¿cómo se organizan y transmiten? ¿cómo y cuándo se expresan? ¿cómo cambian? ¿cuál es el destino de los genes?

1.1. Historia “nobelada” de la Genética: Concepto y método

Puede ser interesante analizar el desarrollo histórico de la ciencia Genética a la luz de cómo la propia comunidad científica ha percibido en diferentes momentos la importancia de los distintos planteamientos conceptuales y metodológicos.

En 2001, Trisha Gura hacía un balance en la revista *Nature* de los cien años de la institución Nobel y se preguntaba si los galardonados reflejan el modo en que se hace la ciencia en el siglo XXI. Mi contestación, en lo que a la Genética se refiere, es afirmativa tanto en su contenido formal (concepto de la disciplina) como a la metodología, recordando el trípode básico que constituye la “regla de oro de la investigación”: planteamiento de una pregunta importante, en qué material biológico se va a tratar de responder la cuestión y con qué metodología experimental.

En 1995, cuando ingresé como Académico de Número en la Real Academia Nacional de Farmacia, elegí como tema de mi discurso de ingreso la “Historia ‘nobelada’ de la Genética: Concepto y método”, dado que se da la casual circunstancia de que tanto la institución Nobel como la ciencia Genética nacieron con el siglo XX (en 1901 y 1900, respectivamente). Ello me permitió hacer un estudio de cómo la comunidad científica ha reconocido la labor de excelencia de algunos científicos dentro del contenido formal

(concepto) de la Genética y su metodología variante a lo largo de su historia (Lacadena, 1995a).

Con ocasión de la celebración del Congreso de la Sociedad Española de Genética (SEG), que tuvo lugar en Almería del 4 al 7 de octubre de 2005, realicé una revisión y actualización de dicho análisis histórico de la Genética, teniendo en cuenta los diez años transcurridos desde mi ingreso en la Real Academia Nacional de Farmacia en 1995, incluyendo, en consecuencia, los Premios Nobel en Fisiología o Medicina sobre temas genéticos concedidos en los años 1996, 2001, 2002, 2004 y 2006. Dicho trabajo fue gentilmente editado por el Servicio de Publicaciones de la Universidad de León gracias a las gestiones del Profesor Marcelino Pérez de la Vega, Catedrático de Genética y Vicerrector de la misma (Lacadena, 2007).

En un afán de mantener actualizado a la fecha de hoy (diciembre de 2016) el trabajo iniciado hace 20 años, considero necesario incluir también los Premio Nobel en Fisiología o Medicina y en Química relacionados con la Genética concedidos en 2007, 2008, 2009, 2011, 2012, 2013, 2014, 2015 y 2016, años posteriores a la publicación del mencionado libro. Como es lógico, el presente trabajo está basado íntegramente en las publicaciones de 1995 y 2007. El criterio seguido en la presente *addenda* de 2016 ha sido el de mantener intacto los contenidos previos, añadiendo lo que correspondiera a los nuevos premios Nobel incorporados en cada ocasión.

Aunque el título de mi discurso de ingreso en la Real Academia Nacional de Farmacia del Instituto de España en 1995 pudiera parecer algo frívolo o superficial, nada más lejos de la realidad y de mi intención puesto que el objeto del trabajo era realizar un estudio de cómo el concepto y el método de la Genética han quedado reflejados en su propia historia científica puesta de manifiesto en los premios que la Fundación Nobel había concedido desde su creación hasta 1995. Al día de hoy (2016), son 45 los premios concedidos y 98 los científicos galardonados por sus aportaciones relevantes en el campo de la Genética o materias afines.

La Fundación Nobel, con sede en Estocolmo, fue fundada en 1896 por disposición testamentaria de Alfred Nobel (1833-1896) con las rentas de su fortuna, estimada en unos 31 millones de coronas suecas. Los premios de Fisiología o Medicina son concedidos por el Real Instituto Karolinska de Estocolmo, los de Física y los de Química por la Real Academia de Ciencias de Estocolmo, los de Literatura por la Academia Sueca, los de la Paz por una

comisión de cinco miembros nombrados por el Parlamento Noruego y los de Economía, creados por el Banco de Suecia, son supervisados por la Academia de Ciencias. Los premios empezaron a concederse en 1901 y los de Economía desde 1969. Salvo los casos de premios concedidos a instituciones u organizaciones, no se puede otorgar un mismo premio a más de tres personas. Salvo un caso excepcional que hubo, no se puede otorgar el galardón a título póstumo. La ceremonia de entrega de los premios tiene lugar el día 10 de diciembre, coincidiendo con el aniversario de la muerte de Alfred Nobel.

En el **CUADRO 1.1**

se hace una relación cronológica de los premios Nobel que, más o menos directamente, tienen que ver con la investigación genética o temas biológicos afines a ella. De los 45 premios considerados, 35 corresponden a Fisiología o Medicina, 9 a Química y 1 de la Paz.

En el **CUADRO 1.2**

se incluye la relación de los 98 científicos galardonados –de los que solamente 7 de ellos son mujeres: Barbara McClintock (1983), Christiane Nüsslein-Volhard (1995), Linda S. Buck (2004), Françoise Barré-Sinoussi (2008), Elizabeth H. Blackburn, Carol W. Greider y Ada E. Yonath (2009)– que serán objeto del presente estudio (76 de Fisiología o Medicina, 21 de Química y 1 de la Paz).

En el **CUADRO 1.3**

se muestra una relación de los discursos de recepción de los premios que están recogidos en la colección “Les Prix Nobel” *Nobel Foundation, Stockholm* y en la colección en versión inglesa “Nobel lectures”, *Elsevier Publishing Company, Amsterdam-New York*. La revista *Science* también ha publicado los discursos en versión inglesa.

2. EL CONCEPTO DE GENÉTICA

Como ya he tenido ocasión de decir en escritos anteriores (Lacadena, 1985, 1986, 1988), en un sentido estricto, el nacimiento de una nueva ciencia –la Genética- que explicara los fenómenos hereditarios biológicos habría de estar condicionado a su capacidad para dar respuesta a las dos preguntas fundamentales siguientes: ¿cuáles son las leyes por las que se transmiten los caracteres biológicos de padres a hijos? ¿cuál es la base física –es decir, la sustancia- por la que tales características hereditarias se conservan y transmiten? O, en otras palabras, ¿cuál es la base molecular de la herencia? La respuesta a la primera pregunta fue conocida a partir de las experiencias de Gregor Johann Mendel hechas públicas en 1865 en dos sesiones consecutivas (8 de febrero y 8 de marzo) de la Sociedad de Naturalistas de Brünn, Moravia (hoy Brno, República Checa) y publicadas a finales del año siguiente, 1866, en el tomo IV de las Actas de la Sociedad. La respuesta a la segunda pregunta está en íntima relación con la historia del ácido desoxirribonucleico, ADN, que se inicia en 1869 cuando Miescher escribió el artículo (aparecido en 1871) en el que describía la “nucleína” como una “sustancia ácida rica en fósforo” aislada por vez primera de los núcleos de las células de pus y después de otros tipos de células (levaduras, riñón, hígado, testículos y glóbulos rojos nucleados). La “nucleína” fue rebautizada en 1889 por Richard Altmann como *ácido nucleico*. Sin embargo, la identificación de la sustancia o material hereditario como ADN – los genes son ADN- no se produjo hasta 1944 cuando Avery, MacLeod y McCarty identificaron el ADN como el *principio transformante* de Griffith (1928) en el fenómeno de transformación bacteriana. Por ello, se deduce que es incorrecto decir –como suele hacerse- que la Genética nació como ciencia en 1900 cuando de Vries, Correns y Tschermak redescubrieron las denominadas leyes de Mendel. En mi opinión, y de acuerdo con lo expuesto anteriormente, el parto de la Genética duró 80 años puesto que empezó en 1865 con el trabajo de Mendel y terminó en 1944 con la identificación del ADN como el material hereditario.

De ambos tipos de planteamientos se derivan dos definiciones diferentes de la Genética: la propuesta por Bateson en 1906 como “la ciencia que estudia la herencia y la variación en los seres vivos” y la que propuse yo mismo como “la ciencia que estudia el material hereditario bajo cualquier nivel o dimensión” (Lacadena, 1974, 1988).

El desarrollo de la Genética a partir del redescubrimiento de las leyes de Mendel en 1900 fue muy rápido y, posiblemente, igualado por muy pocas ciencias. Su progreso ha estado impulsado por tres fuerzas. La primera en orden cronológico fue su inmediata aplicación a la Mejora de plantas y animales. Aquí habría que tener en cuenta su propio origen como consecuencia de la actividad de los mejoradores y criadores de plantas y animales, recordando que las reuniones que hoy se consideran como los tres primeros congresos internacionales de Genética se convocaron como “International Conference on Hybridization” (Londres, 1899), “International Conference on Plant Breeding and Hybridization” (Nueva York, 1902) y “Conference on Hybridization and Plant Breeding” (Londres, 1906). Y fue precisamente en esta tercera reunión donde William Bateson propuso el nombre de “Genética” para la actividad que allí les reunía y que “había dejado de ser un misterio para convertirse en ciencia”, decidiéndose que los resúmenes y acuerdos de dicha reunión se publicaran bajo el nuevo epígrafe de “Third International Conference on Genetics”.

La segunda fuerza que ha impulsado el progreso de la Genética radica en su aplicación a la Medicina, convirtiendo al ser humano en beneficiario directo del conocimiento genético.

Por último, pero no por eso menos importante, hay que tener en cuenta que la Genética puede aportar luz al conocimiento básico del fenómeno vital: su esencia, origen y evolución.

Cuando se tiene una perspectiva global de la Genética se percata uno de la posición que ocupa entre las ciencias biológicas. Así, el profesor Julián Rubio (1973), tras examinar las relaciones interdisciplinarias entre la Genética y otras ciencias biológicas (Citología, Bioquímica, Fisiología, Microbiología, Botánica, Zoología, Ecología, Agronomía, Zootecnia, Medicina), concluía que la Genética ocupa un puesto central porque con todas ellas tiene conexión en contenido y desarrollo histórico, ofreciendo un punto de vista aglutinante del pensamiento biológico actual. Es –decía el profesor Rubio- “como un relieve orográfico en una llanura, observatorio desde el cual se consigue una visión nueva de todo el paisaje circundante, pero siendo al mismo tiempo desde los diversos puntos de la llanura desde donde se logra precisar el perfil característico [diferente] de ese relieve”. En la llanura de ese panorama descrito podrían situarse también las ciencias experimentales no biológicas como la Física, la Química, las Matemáticas y la Geología.

Esta relación múltiple de la Genética con las demás ciencias implica una enorme diversidad de organismos y de técnicas de estudio que pueden llevar –como se lamentaba Hadorn en su alocución presidencial del XI Congreso Internacional de Genética (La Haya, 1963)- a una diversificación y divergencia tan grandes entre los diferentes campos de investigación de la Genética que conduzcan a una falta de entendimiento mutuo entre las diversas especialidades, con la consiguiente desintegración y secesión. Las técnicas experimentales, los organismos manejados y los problemas abordados son tan dispares que puede resultar incluso ininteligible el lenguaje utilizado por los diversos especialistas.

Sin embargo, a pesar de la especialización de la Genética a nivel de organismos (Genética de virus, Genética de bacterias, Genética de hongos, ..., Genética humana), a nivel de organización (Genética Molecular, Citogenética, Genética Mendeliana, Genética de Poblaciones) o a nivel de proceso (Genética del Desarrollo, Genética Evolutiva), se mantiene un concepto unitario gracias a la existencia de un denominador común: el material hereditario. Tan genético es quien estudia el material hereditario de los virus (Genética de virus) como quien analiza cómo se organiza y transmite (Citogenética), cómo se expresa (Genética Molecular) o cuál es su destino en el espacio y en el tiempo (Genética Evolutiva). De ahí que adquiriera todo su significado la definición propuesta de Genética como “la ciencia que estudia el material hereditario bajo cualquier nivel o dimensión”.

Como señalaba Rubio (1973), el material hereditario se puede estudiar bajo tres dimensiones: analítico-estructural (en sí mismo), dinámica (propiedades y expresión) y espacio-temporal (destino). En otras palabras, el objeto de la Genética son los genes y, por tanto, esta ciencia ha de proporcionar respuestas adecuadas a las siguientes preguntas:

- ¿qué son los genes?
- ¿cómo se organizan y transmiten?
- ¿cómo y cuándo se expresan?
- ¿cómo cambian?
- ¿cuál es su destino en el espacio y en el tiempo?

En mi opinión, en el desarrollo histórico de la Genética pueden diferenciarse *grosso modo* las etapas recogidas en el Cuadro 2.1.

Finalmente, dentro de la cronología histórica de la Genética, es importante resaltar que la identificación en 1944 del ADN como el material hereditario supuso un cambio de paradigma en la Genética –ampliable a la Biología en general e incluso a la Sociedad– de tal importancia que puedo repetir aquí lo que ya he dicho en otras ocasiones (Lacadena, 1988): la Historia de la Genética puede dividirse en dos grandes épocas –“antes del ADN” y “después del ADN”– que en estos momentos se corresponden a periodos de tiempo más o menos equivalente (1865-1944, 1944-2016). Utilizando un juego de palabras, podríamos hablar de “la transformación de la Genética por el ADN” (Lederberg, 1994), haciendo referencia a la demostración experimental que supuso el fenómeno de transformación bacteriana y la identificación del ADN como principio transformante.

CUADRO 2.1. ETAPAS CRONOLÓGICAS DEL DESARROLLO DE LA GENÉTICA.

1865 (1900) -1940:	Genética de la transmisión
1940 – 1960:	Naturaleza y propiedades del <i>material hereditario</i> .
1960 – 1975:	<i>Mecanismos de acción génica</i> : Expresión (código, transcripción, traducción) y regulación de los genes. Desarrollo.
1975 – 1985:	<i>Nueva Genética</i> , basada en la tecnología de los ácidos nucleicos (fragmentación, hibridación, secuenciación, amplificación).
1985 – 1990:	<i>Genética Inversa</i> : Análisis genético dirección gen → proteína.
1990 – 2016:	<i>Transgénesis</i> : Transmisión “horizontal” de la información genética. Plantas y animales transgénicos. Terapia génica humana.
1995 – 2016:	<i>Genómica</i> : Disección molecular del genoma de los organismos (bacterias, eucariontes, Proyecto Genoma Humano). <i>Genómica estructural y Genómica funcional. Genómica comparada. Genómica ambiental y Metagenómica. Genómica sintética. Edición genómica.</i>
1997 – 2016:	<i>Clonación</i> en mamíferos por transferencia de núcleos.
1998 – 2016:	<i>Reprogramación nuclear: Células troncales embrionaria, células troncales pluripotentes inducidas y reprogramación directa en mamíferos</i> : Terapia celular y Medicina regenerativa

3. LA APORTACIÓN DE LOS PREMIOS NOBEL AL CONTENIDO FORMAL DE LA GENÉTICA

En el apartado anterior hemos justificado el concepto de Genética como la ciencia que estudia el material hereditario bajo cualquier nivel o dimensión y ello nos llevaba a concluir que su contenido formal viene dado por las respuestas a las preguntas en torno a los genes: ¿qué son? ¿cómo se organizan y transmiten? ¿cómo y cuándo se expresan? ¿cómo cambian? ¿cuál es su destino? Pasemos, pues, a analizar cuáles han sido las aportaciones de los diferentes premios Nobel en la contestación a tales cuestiones*:

1. ¿Qué son los genes?

- Química de los ácidos nucleicos (1893-1894): Kossel (1910)
- Síntesis de nucleótidos (1952): Todd (1957)
- Los genes son ADN. Fagos radiactivos (1952): Hershey (1969)
- Modelo estructural del ADN (1953): Watson, Crick y Wilkins (1962)

2. ¿Cómo se organizan y transmiten los genes?

- Estructura de la cromatina (1974, 1977): Kornberg, R.D. (2006), Klug (1982)
- Estructura del cromosoma eucariótico: telómeros y telomerasa (1982, 1985, 1989): Blackburn, Greider y Szostak (2009)
- Transmisión molecular:
 - Replicación semiconservativa (1953) (propuesta por Watson y Crick, 1959)
 - Síntesis enzimática del ADN (1956): Kornberg, A. (1959)
 - Síntesis enzimática del ARN (1955): Ochoa (1959)
- Transmisión celular: teoría cromosómica de la herencia.
 - Los genes están en los cromosomas (1910): Morgan (1933)
 - Control genético del ciclo celular (1970, 1981) y ciclinas (1983): Hartwell, Hunt y Nurse (2001)
 - Sobrecruzamiento y recombinación (1931): McClintock (1983)

3. ¿Cómo y cuándo se expresan los genes?

- Hipótesis un gen-una enzima (1941): Beadle y Tatum (1958)
- Hipótesis de la secuencia (1958): Crick (1962)
- Desciframiento de la clave del código genético (1961): Ochoa (1959), Nirenberg y Khorana (1968)

- El ARN mensajero (1961): Jacob (1965) y Brenner (2002)
- Análisis molecular de la transcripción en eucariontes (2001): Kornberg, R.D. (2006)
- Análisis molecular de la traducción: estructura molecular y función del ribosoma (1980s, 1998, 2000): Ramakrishnan, Steitz y Yonath (2009)
- El ARN transferente (1965): Holley (1968)
- Genes discontinuos (1977): Sharp y Roberts (1993)
- Procesamiento y actividad catalítica del ARN (1981, 1983): Altman y Cech (1989)
- Regulación de la expresión génica. Modelo del operón (1961): Jacob y Monod (1965)
- Regulación de la expresión génica mediante interferencia del ARN (1998): Fire y Mello (2006)
- Control genético del desarrollo embrionario temprano en *Drosophila* (1978, 1980): Lewis, Nüsslein-Volhard y Wieschaus (1995)
- Control genético de la organogénesis y de la muerte celular programada en *Caenorhabditis elegans* (1974, 1977, 1986): Brenner, Horvitz y Sulston (2002)
- Utilización de los ratones knockout (tecnología knockout) en estudios de genética del desarrollo (1981, 1986, 1987): Capecchi, Evans y Smithies (2007)
- Utilización del gen de la proteína fluorescente verde (GFP) para detectar la expresión de los genes (1994): Chalfie (2008)
- Reprogramación celular. Transferencia nuclear (1962) e inducción de células troncales pluripotentes (2006): Gurdon y Yamanaka (2012)

4. ¿Cómo cambian los genes?

- Inducción de mutaciones con rayos X (1927): Muller (1946)
- Mutagénesis dirigida (1978): Smith (1993)
- Elementos genéticos móviles (1951): McClintock (1983)
- Mecanismos de reparación del ADN (1974, 1989, 1983): Lindahl, Modrich y Sancar (2015)

5. ¿Cuál es el destino de los genes en el espacio y en el tiempo?

- Ningún premio Nobel, hasta ahora

*Las fechas indicadas en primer lugar, corresponden a las de publicación de los trabajos originales fundamentales, mientras que las que aparecen detrás de los nombres hacen referencia a las de concesión del premio Nobel correspondiente.

3.1. ¿Qué son los genes?

Hacia la misma época y a no muchos kilómetros de Brünn donde residía Mendel, Friedrich Miescher, trabajando en el laboratorio de Hoppe-Seyler de la Universidad de Tübingen, escribía en octubre de 1869 (aunque el artículo apareció publicado en 1871) el trabajo en el que se describía la “nucleína” como una sustancia ácida “rica en fósforo” contenida en los núcleos (de ahí su nombre) de las células de pus y otros tipos de células (levaduras, riñón, hígado, testículos y glóbulos ro nucleados). Sin embargo, Miescher no pudo aislar el ácido nucleico en forma pura pues la “nucleína” tenía un 70% de proteínas. Fue Richard Altmann quien en 1889 lograba separar por vez primera las proteínas de la “nucleína”, llamando a la otra sustancia *ácido nucleico*. Por su parte, diez años después de que Miescher aislara la “nucleína”, Albrecht Kossel (1893, 1894) iniciaba los estudios químicos de la “nucleína”, descubriendo que contenía las bases púricas adenina y guanina y las bases pirimidínicas timina y citosina, así como un azúcar que más tarde fue identificada por Levene y Jacobs como D-ribosa. Sin embargo, el mismo Levene encontró e identificó el azúcar 2'-desoxi-D-ribosa propia del ácido desoxirri-bonucleico. Kossel recibió el premio Nobel en 1910 “por sus trabajos sobre las sustancias albuminoides, incluyendo las nucleínas, que han contribuido al conocimiento de la química de las células”.

El trabajo de Mendel y el trabajo de Miescher tienen en común que, no sólo ambos representan el punto de arranque para contestar las dos preguntas fundamentales de la Genética (las leyes de transmisión y la base molecular de la herencia), sino también el que fueron olvidados o minusvalorados en su tiempo. Sin embargo, así como el trabajo de Mendel dio lugar, tras un periodo de treinta y cinco años de oscuridad, a una gran actividad científica encaminada a verificar sus conclusiones y plantear nuevas hipótesis que condujeron al establecimiento definitivo de la nueva ciencia a través de la Teoría Cromosómica de la Herencia, el trabajo de Miescher resultó de interés para un pequeño grupo de bioquímicos, pero no generó, ni mucho menos, una ulterior investigación masiva. Como señala Glass (1965), la ceguera de los científicos para no ver el significado de una sustancia química tan especialmente limitada al núcleo de las células e, incluso, a los propios cromosomas perduró hasta 1944 en que Avery, MacLeod y McCarty identificaron el ADN como el “principio transformante” de Griffith en el fenómeno de transformación bacteriana.

¿Por qué sucedieron así las cosas? Todos los historiadores de la Biología están de acuerdo en afirmar que el escaso interés inicial por el ADN desde el punto de vista hereditario era debido a que en aquella época eran las proteínas las más firmes candidatas a ser la “substancia de la herencia” debido a una aparentemente mayor variabilidad frente al ADN, contribuyendo aún más a esta apreciación equivocada la *hipótesis del tetranucleótido* de Levene (1921) –uno de los grandes bioquímicos de la época- que suponía que el ácido nucleico estaba formado por la repetición monótona de cuatro nucleótidos. Corroborando esta situación, resultan muy significativas las influyentes palabras del citólogo americano Edmund B. Wilson quien en la tercera edición de su importante obra “The Cell in Development and Heredity” (1925) decía, recogiendo el pensamiento biológico de la época: “... los ácidos nucleicos del núcleo son en conjunto notablemente uniformes... en contraste con las proteínas... Las diferencias entre diferentes “cromatinas” depende de sus componentes básicos o proteicos y no de sus ácidos nucleicos”.

Por ello, la evidencia experimental aportada por Avery y colaboradores (1944) identificando el ADN como el principio transformante no fue suficiente para convencer a la comunidad científica de que los genes eran ADN y no proteínas. Tuvieron que pasar ocho años más hasta que Hershey y Chase (1952), utilizando bacteriófagos marcados radiactivamente con S^{35} o P^{32} (el azufre como elemento químico propio de las proteínas y el fósforo del ADN) demostraron que en el proceso de infección solamente penetraba en la célula bacteriana el ADN viral y puesto que en la misma se producía la formación de partículas virales era una evidencia irrefutable de que el ADN viral llevaba la información genética responsable de la síntesis de los compuestos proteicos que constituyen la cápside del virus. Es decir, los genes son ADN. A partir de este experimento la comunidad científica abandonó definitivamente su postura en favor de las proteínas y tuvo que valorar positivamente los datos experimentales que ocho años antes habían obtenido Avery, MacLeod y McCarty. En 1969, Alfred D. Hershey compartió el premio Nobel con Delbrück y Luria “por sus descubrimientos en relación con el mecanismo de replicación y estructura genética de los virus”. Hershey (1946) había estudiado también las mutaciones en los fagos y realizó el primer estudio completo de la recombinación genética en los mismos (Hershey and Rotman, 1949).

Un estudio histórico sobre la historia del descubrimiento de la estructura y función de la “substancia genética” fue realizado por Portugal y Cohen (1977).

Una vez aceptado el significado genético del ADN, el paso obligado siguiente era determinar sus propiedades físico-químicas. El descubrimiento por James D. Watson y Francis H. C. Crick en 1953 de la estructura del ADN fue fundamental para el desarrollo posterior de la Genética. El éxito de Watson y Crick se basó, por un lado, en saber utilizar los datos de composición química (Chargaff, 1950: las proporciones de bases púricas y pirimidínicas eran equimolares, lo mismo que las de adenina y timina y las de guanina y citosina; es decir: $A+G/T+C=1$ y $A/T=G/C=1$) y de difracción de rayos X (Wilkins *et al.*, 1953; Franklin and Gosling, 1953) obtenidos por otros investigadores y, por otro lado, -y a mi juicio en ello radicó su acierto- en tener muy claro el concepto genético de lo que significaba el material hereditario; es decir, cuál tenía que ser su función.

En Biología, el binomio estructura-función se manifiesta de forma constante; es decir, si existe una estructura determinada es para realizar una cierta función y, recíprocamente, para llevar a cabo una función concreta es necesaria la estructura adecuada. Por ello, a la hora de proponer un modelo estructural del ADN había que tener presente cuál o cuáles eran las funciones que tenían que realizar el material hereditario. Este planteamiento fue utilizado por Watson y Crick como pone de manifiesto el hecho de que, junto al artículo de la revista *Nature* en la que proponían el modelo estructural de la doble hélice, publicaron un segundo artículo que titularon “Implicaciones genéticas de la estructura del ácido desoxirribonucleico” (Watson and Crick, 1953*b*) en el que justificaban cómo su modelo estructural podía explicar dos propiedades genéticas fundamentales del material hereditario: la de conservarse a sí mismo (*replicación*) y la de ser capaz de cambiar (*mutación*). Posiblemente, esa clarividencia genética contribuyó de forma decisiva a ganarle la carrera a Linus Pauling, dos veces galardonado con el premio Nobel por otras razones, quien competía con ellos en la búsqueda del modelo estructural del ADN. Watson y Crick recibieron el premio Nobel en 1962 “por sus descubrimientos en relación con la estructura de los ácidos nucleicos y su significación para la transmisión de la información en la materia viva”. Compartió el premio con ellos Maurice H.F. Wilkins, cuyos estudios sobre la difracción de rayos X (Wilkins *et al.*, 1953) contribuyeron de forma fundamental -como ya he mencionado antes- al modelo estructural de la doble hélice.

Para un conocimiento histórico de las investigaciones que condujeron al establecimiento del modelo estructural del ADN, ver Watson (1968), Crick (1974, 1988), Olby (1974*a y b*), Pauling (1974), Chargaff (1974), Klug (1974).

No resisto la tentación de hacer un breve comentario personal –sin duda subjetivo– sobre Watson y Crick. En mis clases de Genética en la universidad solía recomendar a mis alumnos la lectura de tres obras que causaron en mí un gran impacto y que considero pueden serles de gran utilidad en su formación científica. La primera es el trabajo original de Mendel (1866) porque, como señalaba el profesor Francisco J. Ayala (1984), “el trabajo clásico de Mendel constituye un ejemplo eminente del uso del método científico en Biología”; ciertamente, es una aplicación perfecta del método hipotético-deductivo de investigación porque “Mendel formuló hipótesis, examinó su coherencia con los resultados previos y, a continuación, sometió la hipótesis a rigurosas pruebas empíricas y sugirió, asimismo, pruebas adicionales a realizar” (ver también Lacadena, 1986).

La segunda obra es el discurso de ingreso de Santiago Ramón y Cajal en la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales de Madrid, leído en la sesión del 5 de diciembre de 1897. Al leer este discurso, titulado “Reglas y consejos sobre investigación científica (los tónicos de la voluntad)”, tuve la sensación de estar sentado junto a él escuchando sus consejos, todavía válidos a pesar del tiempo transcurrido. El único cambio que habría que introducir sería la sustitución del idioma alemán por el inglés cuando hace referencia al idioma científico universal.

La tercera obra es “La doble hélice” escrita por Watson (1968) en la que, de forma autobiográfica, relata sus experiencias vitales en torno al descubrimiento de la estructura del ADN y en la que se ponen de manifiesto las intrigas, insidias y –diríamos– manejos poco limpios del mundo científico. En esta obra el estudiante puede encontrar, junto a páginas y hechos estimulantes, situaciones en las que la competitividad puede llevar a comportamientos no éticos (ver más adelante algún comentario adicional sobre este tema).

En cierto sentido, Watson puede resultar un premio Nobel atípico teniendo en cuenta que ha publicado muy pocos trabajos científicos y, por lo general, muy breves. Sin embargo, al decir ésto no pretendo, ni mucho menos, restarle mérito alguno ni dudar de su papel fundamental e influencia en el desarrollo de la Genética. De hecho, el propio Crick reconocía que sin el concurso de Watson él no hubiera llegado al modelo estructural del ADN. Por otro lado, considero la importancia del papel que ha jugado Watson en su puesto al frente del Cold Spring Harbor Laboratory, New York, como catalizador del progreso de la Genética mundial como consecuencia de sus reuniones y publicaciones (*Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, etc.), así como de su obra “Molecular Biology of the Gene”

(1ª edición, 1965; 4ª edición, Watson *et al.*, 1987), su participación en la obra clásica “Molecular Biology of the Cell” (Alberts *et al.*, 1989) o de su papel como impulsor del Proyecto Genoma Humano.

Por su parte, además de su participación en el modelo estructural del ADN, Crick ha tenido otras aportaciones importantes en la Genética como son su fundamental –yo diría que genial- *hipótesis de la secuencia* (Crick, 1958), a la que haremos referencia posteriormente, así como su contribución al establecimiento de las características de la clave del código genético (Crick *et al.*, 1961) y sus hipótesis sobre la existencia del *adaptador* (Crick, 1958) (más tarde identificado como el ARN transferente) en el proceso de traducción y la de la flexibilidad o tambaleo en la complementariedad codón-anticodón (Crick, 1966). No es de extrañar, por ello, que su discurso de recepción del premio Nobel en 1962 versara sobre el código genético y no sobre la estructura del ADN cuyo descubrimiento había sido el motivo de la concesión. (Ver su narración autobiográfica, Crick, 1988).

La reunión anual del Cold Spring Harbor Laboratory de junio de 1966, que trató el tema del Código Genético, supuso para Crick y otros genéticos moleculares el fin de la Biología Molecular clásica y decidieron introducirse en nuevos campos de investigación biológica. Como indica en su autobiografía (Crick, 1988), se interesó por la embriología y el papel de los gradientes como característica básica del desarrollo, la estructura de los nucleosomas (Crick and Klug, 1975), el “ADN egoísta” (Orgel and Crick, 1980), el origen de la vida (Crick, 1981), para terminar en la neurobiología eligiendo el sistema visual de los primates. Finalmente, su interés por el cerebro le ha llevado a plantearse el misterio de la consciencia: la búsqueda científica del alma (Crick, 1990). A lo largo de su vida, Crick demostró ser un gran pensador científico.

3.2. ¿Cómo se organizan y transmiten los genes?

Trataremos ambas preguntas por separado:

1. ¿Cómo se organizan los genes?

Los genes no se encuentran dispersos dentro de las células, sino que están organizados constituyendo una estructura denominada cromosoma. El *cromosoma* se puede definir como “el material hereditario organizado cuya estructura adquiere complejidad creciente en la evolución, pasando de simples moléculas desnudas de ácidos

nucleicos en algunos procariontes a asociaciones de ácidos nucleicos (especialmente ADN) con proteínas histónicas y no histónicas como componentes químicos mayoritarios en eucariontes. La función esencial de los cromosomas es conservar, transmitir y expresar la información genética que contienen” (Lacadena, 1988). Es evidente que en esta definición quedan comprendidos no sólo los cromosomas propios, por así decirlo, de cualquier organismo, sino también elementos genéticos adicionales tales como los plasmidios y el ADN de orgánulos citoplásmicos como mitocondrias y cloroplastos.

a) *Estructura química: la cromatina*

En la definición anterior se indica que la estructura del cromosoma eucariótico es una interacción compleja entre el ADN y las proteínas de naturaleza histónica y no histónica. Aunque el término *cromatina* fue definido inicialmente con un significado citológico puramente descriptivo como “la sustancia que constituye el núcleo interfásico y muestra ciertas propiedades de tinción” (Flemming, 1882), hoy día el concepto de cromatina se utiliza también y de forma mayoritaria para hacer referencia a la organización molecular del material hereditario. En este contexto molecular, para algunos autores la cromatina es “el conjunto complejo de ADN, histonas, proteínas no histonas y ARN presentes en el núcleo interfásico” (Rieger *et al.*, 1976, 4ª edición). Sin embargo, otros autores entienden por cromatina únicamente la asociación del ADN y las histonas formando una estructura que responde a una ordenación espacial regular: los *nucleosomas* (Kornberg, 1974). Algunos autores piensan, incluso, que el ARN y las proteínas no histónicas no son constituyentes verdaderos de la estructura cromosómica, considerando, por ejemplo, que el ARN detectado no es más que un ARN naciente producto de la transcripción y que las proteínas no histonas tengan una misión enzimática o reguladora, pero no estructural. Por ejemplo, Rieger *et al.* (1991), en la 5ª edición de su Glosario, eliminan el ARN en la definición de cromatina antes indicada. Aunque sin duda ésto pueda ser así en cierta medida, sin embargo, hay alguna evidencia experimental en favor de un posible papel estructural tanto de las proteínas no histónicas como del ARN.

La estructura nucleosomal de la cromatina, inicialmente descrita por Roger D. Kornberg (1974), fue objeto del análisis detallado de Aaron Klug y colaboradores, quienes analizaron con microscopía electrónica, difracción de neutrones y difracción de rayos X la médula del nucleosoma formado por el octámero de histonas envuelto por una vuelta y tres cuartos de ADN (Finch *et al.*, 1977; Klug *et al.*, 1980; Richmond *et al.*, 1984; Klug *et al.*, 1985).

La estructura nucleosomal no es rígida, sino que permite adaptarse a estructuras de orden superior de la cromatina. Así, Finch y Klug (1976) propusieron la formación de solenoides de 20-30nm de diámetro como estructura básica de la cromatina interfásica. Aaron Klug recibió el premio Nobel de Química en 1982 “por su desarrollo de la microscopía electrónica cristalográfica y su elucidación estructural de complejos de ácidos nucleicos y proteínas biológicamente importantes”. Además de su investigación sobre la estructura de la cromatina analizó también las interacciones ARN-proteínas en el virus del mosaico del tabaco (TMV) determinantes de su propia morfogénesis (Butler and Klug, 1971, 1978; Champness *et al.*, 1976).

Aquí se debe señalar que Roger D. Kornberg recibió a su vez el Premio Nobel en 2006 por su análisis cristalográfico del mecanismo molecular de la transcripción en eucariontes utilizando métodos similares, tal como se comentará después.

b) *Estructura del cromosoma eucariótico: los telómeros y la telomerasa*

Como científico que he dedicado más de treinta años de mi vida a la investigación citogenética en el campo del “comportamiento cromosómico” –entendiendo por comportamiento cromosómico “cualquier cambio fisiológico, estructural o dinámico que experimentan los cromosomas en cualquier tipo de célula (somática o germinal) tanto en períodos de división (mitosis o meiosis) como en interfase” – ha supuesto una satisfacción que el Premio Nobel en Fisiología o Medicina 2009 otorgado por la Asamblea Nobel del Instituto Karolinska haya recaído en un tema citogenético básico como es la estructura del cromosoma eucariótico (los telómeros y el mecanismo molecular que los mantiene, la telomerasa) en las personas de tres científicos: Elizabeth H. Blackburn, Carol W. Greider y Jack W. Szostak, premiados por el descubrimiento de “cómo los cromosomas son protegidos por los telómeros y la enzima telomerasa”. Los tres habían recibido en 2006 el premio Albert Lasker en Investigación Médica Básica, confirmando una vez más que los premios Albert Lasker son una antesala de los premios Nobel.

Frente al concepto clásico de la Genética como “la ciencia que estudia la herencia y la variación en los seres vivos” (Bateson, 1906), hace años que propuse yo la definición de la Genética como “la ciencia que estudia el material hereditario bajo cualquier nivel o dimensión” (Lacadena, 1981). De ahí se deduce que el objeto de la Genética son los genes y que el contenido formal trate de dar respuestas adecuadas a las siguientes preguntas:

¿qué son los genes? ¿cómo se organizan y transmiten? ¿cómo y cuándo se expresan? ¿cómo cambian? ¿cuál es su destino en el espacio y en el tiempo? (Lacadena, 1995, 1999).

En este contexto, recordemos que el cromosoma se puede definir como “el material hereditario organizado cuya estructura adquiere complejidad creciente en la evolución, pasando de simples moléculas desnudas de ácidos nucleicos en algunos procariontes a asociaciones complejas de ácidos nucleicos con proteínas histonas y no histonas como componentes químicos mayoritarios en eucariontes. La función del cromosoma es conservar, transmitir y expresar la información genética que lleva” (Lacadena, 1981). Partiendo de esta definición y en paralelismo con la definición conceptual de la Genética, la Citogenética se puede definir como “la ciencia que estudia el cromosoma (el material hereditario organizado) bajo cualquier nivel o dimensión” (Lacadena, 1996).

Como he hecho en otras ocasiones similares, cuando me enteré por los medios de comunicación cuál era el tema de investigación galardonado y quiénes los científicos premiados fui a comprobar en los libros de texto de los que soy autor –en este caso, el de “Citogenética” (Lacadena, 1996)– cómo había tratado el tema correspondiente y pude comprobar que en el Capítulo 4 referente a la “Estructura interna del cromosoma eucariótico: diferenciaciones estructurales y su función” dedico cinco páginas (pp. 103-107) a los telómeros y la telomerasa, incluyendo casi una veintena de referencias en las que aparecen alguno de los tres galardonados (Blackburn, Greider o Szostak). Por ello, permítaseme recoger aquí lo que, en 1996, en el texto aludido (4), decía al respecto:

Los telómeros son los extremos de los brazos cromosómicos; su denominación se debe a Muller (1938) ... Desde el punto de vista molecular, los telómeros –complejos de ADN terminal y proteínas– son estructuras especiales de ADN con funciones específicas esenciales para el normal comportamiento de los cromosomas eucarióticos lineales. Estas funciones incluyen su estabilidad (que no se puedan fusionar los extremos cromosómicos entre sí ni sean atacables por exonucleasas) y capacidad de replicación (Szostak *et al.*, 1984).

Dadas las características moleculares de la síntesis del ADN (semiconservativa, dirección 5'→3', semidiscontinua) surgió el problema de cómo explicar la replicación de una molécula lineal de ADN sin que se produjera pérdida de secuencias terminales (las correspondientes al ARN primer). De hecho, se propusieron varios modelos basados en la estructura palindrómica del ADN telomérico que resultaron ser incorrectos. Incluso, el

propio Szostak, galardonado con el premio Nobel, propuso alguna modificación, aunque manteniendo la estructura palindrómica (Szostak, 1982).

Los primeros y fundamentales estudios sobre la estructura del ADN telomérico y su comportamiento durante la replicación mediante la actividad de una enzima específica –la *telomerasa*– fueron realizados principalmente por Elisabeth H. Blackburn y colaboradores (ver revisiones en Blackburn y Szostak (1984), Szostak (1989), Blackburn, 1991a, 1991b).

El aislamiento del ADN telomérico de eucariontes inferiores (ciliados, flagelados, levaduras, etc.) demostró que cada telómero consta de varios centenares de pares de bases originados por la repetición de una secuencia del tipo $5'(T/A)_mG_n3'/3'(A/T)_mC_n5'$ (donde $m=1-4$, $n=1-8$), con la particularidad de que hay un extremo monocatenario 3' de 12-16 bases rico en G porque existen varias copias de la secuencia $5'(T/A)_mG_n3'$ sin las bases complementarias correspondientes (Blackburn y Szostak, 1984). Posteriormente se comprobó que dicho modelo se ajustaba también a eucariontes superiores, tanto animales (vertebrados, insectos, etc.) como vegetales. Por ejemplo, en la especie humana se demostró que la secuencia que se repite en la hélice “rica en G” del ADN es $5'TTAGGG3'$ (Moyzis *et al.*, 1988). La longitud total del ADN telomérico en los cromosomas de vertebrados es mayor que la de los eucariontes inferiores (miles de pb frente a varios cientos). De cualquier manera, resulta sorprendente la similitud del ADN telomérico de especies tan diversas como las que se indican a continuación, aunque, por otro lado, no es ilógica dada la igualdad de la función a realizar:

Organismos	Secuencia repetida (hélice rica en G)	Organismos	Secuencia repetida (hélice rica en G)
<i>Tetrahymena</i>	$5'TTGGGG3'$	<i>Trypanosoma</i>	$5'TT(T/C)AGGG3'$
<i>Paramecium</i>	$5'TT(T/G)GGG3'$	<i>Dictyostelium</i>	$5'TTAGGG3'$
<i>Oxytricha</i>	$5'TTTTGGGG3'$	<i>Arabidopsis</i>	$5'TG_{1-8}G3'$
<i>Plasmodium</i>	$5'TTAGGG3'$	<i>Homo</i>	$5'TTTAGGG3'$

Resulta interesante señalar la posibilidad de que las hélices ricas en G originen estructuras de ADN cuadruplexo al formarse cuartetos de guanina unidos mediante enlaces de tipo Hoogsteen que pueden tener una significación funcional como, por ejemplo, preservar a los extremos cromosómicos de una posible degradación enzimática. De hecho, se ha demostrado que una proteína telomérica de *Oxytricha* promueve la formación de los cuartetos de guanina. También se ha demostrado que la secuencia telomérica humana 5'CCCTAA3' de la hélice "rica en C" puede producir una estructura cuadruplexa del ADN por apareamiento de la citosina con la citosina protonada.

Hay que señalar también que se ha detectado la existencia de proteínas teloméricas (Blackburn, 1991a, 1991b). Las únicas proteínas que se interaccionan de forma específica con el ADN telomérico son la telomerasa y las proteínas teloméricas. De éstas algunas se unen al ADN dúplex telomérico y otras a la terminación monocatenaria 3'. El complejo proteína-ADN telomérico está yuxtapuesto, pero no sobrepuesto, al ADN cromosómico con estructura nucleosomal.

Simultáneamente Jack W. Szostak comprobó que estructuras lineales de ADN (minicromosomas) eran degradadas muy rápidamente al ser introducidas en células de levadura, pero que, sin embargo, cuando las secuencias de Blackburn eran añadidas a los minicromosomas de Szostak y se introducían en células de levadura, ambos investigadores comprobaron que las secuencias de ADN telomérico protegían a los minicromosomas de la degradación (Szostak y Blackburn, 1982).

¿Y qué decir de la telomerasa? Durante la replicación del ADN telomérico, la hélice "rica en G" es sintetizada por una enzima específica –la *telomerasa*– que es una ribonucleoproteína cuyo componente ARN contiene una secuencia complementaria a la de la secuencia repetida telomérica, pudiendo actuar como una terminal transferasa (ver revisiones en Blackburn, 1992, y Lee *et al.*, 1993). La existencia de la actividad telomerasa *in vitro* fue demostrada primero por las galardonadas Greider y Blackburn (1985, 1987, 1989) en extractos acelulares de ciliados y por Morin (1989) en humanos. El componente ARN de la telomerasa de *Tetrahymena* tiene 159b con la secuencia 5'CAACCCCAA3' entre las posiciones 43 a 51 que parece ser el molde para la repetición 5'TTGGGG3' del telómero (Greider y Blackburn, 1989). Por su parte, Romero y Blackburn (1991) mostraron que el ARN de la telomerasa tiene una estructura secundaria conservada.

En el presente contexto, es interesante señalar que en organismos en los que se produce la fragmentación de los cromosomas dentro de su programa de desarrollo es evidente la necesidad de actuación de la telomerasa para “cicatrizarse” los extremos de los nuevos cromosomas construyendo las terminaciones teloméricas. Este proceso fue analizado por Yu y Blackburn (1991) en *Tetrahymena*. Asimismo, en organismos que experimentan el fenómeno de *disminución cromatínica* (fragmentación cromosómica) como *Ascaris lumbricoides* se ha demostrado la creación de nuevos telómeros por acción de la telomerasa (Müller *et al.*, 1991).

No puedo terminar este breve comentario al Premio Nobel en Fisiología o Medicina 2009 sin hacer referencia al caso especial del galardonado Dr. Jack W. Szostak. Cuando se consulta en su página web cuáles son sus líneas de investigación actuales uno se encuentra con que nada tienen que ver con los cromosomas ni con los telómeros sino con el origen de la vida: 1) explorar la replicación del ácido nucleico prebiótico, y 2) explorar la biofísica de nuestro sistema de vesículas replicantes, ambos enfoques para tratar de comprender cómo en el origen de la vida pudo producirse la encapsulación de un ácido nucleico capaz de replicar espontáneamente. Una vez conseguido el sistema se tratará de estudiar qué fuerzas evolutivas entran en juego que favorezcan el valor adaptativo (fitness) de la célula artificial; es decir, la clave de la ventaja selectiva a nivel celular (Hanczyc *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2004; Mansy *et al.*, 2008; Zhu y Szostak, 2009). Más adelante, en el apartado 3.5, se volverá a tratar el tema.

2. ¿Cómo se transmiten los genes?

La transmisión de la información genética puede considerarse a nivel molecular y a nivel celular:

a) *Transmisión molecular*

La transmisión molecular hace referencia, por un lado, al modelo por el cual una molécula de ADN se copia a sí misma dando lugar a dos moléculas idénticas y, por otro lado, a los mecanismos enzimáticos implicados en la síntesis del nuevo ADN.

Como señalaba anteriormente, el acierto de Watson y Crick al proponer su modelo estructural del ADN fue tener presente las propiedades genéticas que tal estructura había de tener. Así, ellos mismos (Watson and Crick, 1953b) ponían de manifiesto que, en términos de autoduplicación, la molécula de ADN representaba realmente “un par de

moldes” complementarios uno del otro (A-T, G-C), explicando la replicación del siguiente modo: “Imaginamos que antes de la duplicación los enlaces hidrógeno [entre bases complementarias, A-T y G-C] se rompen y las dos hélices se desenrollan y separan; luego, cada cadena actúa como molde para la formación sobre sí misma de una nueva cadena compañera, de modo que eventualmente tendremos dos pares de cadenas donde antes sólo había una. Más aún, la secuencia de los pares de bases A-T, G-C habrá sido duplicada exactamente”. Este tipo de duplicación propuesto por Watson y Crick responde a un modelo de *replicación semiconservativa* porque cada nueva molécula de ADN que se forma está constituida por una cadena vieja que ha servido de molde y una cadena nueva complementaria sintetizada a partir de los nucleótidos presentes en el medio. El modelo semiconservativo de replicación del ADN propuesto teóricamente por Watson y Crick en 1953 fue demostrado experimentalmente unos años más tarde por Taylor y colaboradores (1957) en meristemas radiculares de haba, *Vicia faba*, y por Meselson y Stahl (1958) en la bacteria *Escherichia coli*.

En su trabajo, Watson y Crick decían también: “... postulamos que la polimerización de estos monómeros nucleótidos para formar una nueva cadena sólo es posible si la cadena resultante puede formar la estructura propuesta...”, y añadían “si se requiere una enzima especial para llevar a cabo la polimerización... está todavía por ver.”

Esa hipotética enzima fue aislada por Arthur Kornberg y colaboradores en 1956 (Kornberg *et al.*, 1956). Con dicha ADN polimerasa (después denominada ADNpol I) fueron capaces de inducir la síntesis *in vitro* del ADN. Las investigaciones posteriores de Kornberg (1960, 1969, 1978, 1980) permitieron conocer los mecanismos moleculares de la replicación. La biosíntesis del ADN incluye tres etapas principales: 1) la formación de desoxirribonucleósidos monofosfatos (dNMP), 2) su fosforilación a trifosfatos (dNTP) mediante quinasas, y 3) la polimerización de estos trifosfatos por la acción de la ADN polimerasa que cataliza la unión entre unidades mononucleótidas en presencia de un ADN que sirva como molde y de Mg^{++} . El papel de la ADN polimerasa tiene dos características fundamentales: por un lado formar el enlace fosfodiéster entre el grupo 3' hidroxil en el extremo de crecimiento de la cadena de ADN que se está sintetizando y el grupo 5' fosfato del desoxirribonucleótido que se está incorporando en el proceso de síntesis; por otro lado, seleccionar cada desoxirribonucleótido añadido por complementariedad a la cadena de ADN que está sirviendo de molde y que determina además la dirección de síntesis. Arthur

Kornberg recibió el premio Nobel en 1959 “por su descubrimiento de los mecanismos en la síntesis biológica del ácido desoxirribonucleico”.

Aquí habría que hacer también referencia al mecanismo de replicación del cromosoma eucariótico y el papel de la enzima telomerasa para evitar la pérdida de un trozo del ADN telomérico en cada ciclo de replicación que ha sido descrito en el epígrafe 3.2 anterior al glosar el Premio Nobel 2009 concedido a Blackburn, Greider y Szostack.

b). *Transmisión celular de la información genética*

El cromosoma se puede definir como “el material hereditario organizado cuya estructura adquiere complejidad creciente en la evolución, pasando de simples moléculas desnudas de ácidos nucleicos en algunos procariontes a asociaciones complejas de ácidos nucleicos con proteínas histonas y no histonas como componentes químicos mayoritarios. La función del cromosoma es conservar, transmitir y expresar la información genética que lleva” (Lacadena, 1981, 1996).

La primera de las mencionadas funciones –conservar la información genética– se realiza a nivel molecular gracias a la propiedad de replicación del ADN, que ha sido comentada en el párrafo anterior, y a nivel celular por medio de los dos procesos independientes, pero coordinados, que son la mitosis y la citocinesis. Por otro lado, la transmisión generacional de la información genética está relacionada con el proceso de la meiosis.

Todo ello nos lleva a la *teoría cromosómica de la herencia*, cuyo nacimiento se remonta a 1902 cuando Sutton (1902) decía: “Puedo finalmente llamar la atención a la probabilidad de que la asociación de cromosomas paternos y maternos en parejas y su subsiguiente separación durante la división reductora pueda constituir la base física de las leyes mendelianas de la herencia”. Sus propias investigaciones (Sutton, 1902, 1903) junto con las de Boveri (1902) constituyen la base citológica de la teoría genética, por lo que dieron lugar a la llamada *hipótesis de Sutton-Boveri* o *teoría cromosómica de la herencia* (para un análisis más detallado ver Lacadena, 1984b).

A partir de entonces se produjo una avalancha de datos experimentales que confirmaban la hipótesis, quedando definida la teoría cromosómica de la herencia por los tres puntos fundamentales siguientes: 1) los genes están situados en los cromosomas, 2) su ordenación sobre los mismos es lineal, y 3) al fenómeno genético de la recombinación le

corresponde un fenómeno citológico de intercambio de segmentos cromosómicos homólogos producido por el denominado *crossing-over* (Morgan and Cattell, 1912) o sobrecruzamiento.

Fue Thomas Hunt Morgan (1910) quien por vez primera pudo inferir a partir de datos experimentales una relación directa entre un gen (la mutación *30 osib*) y un cromosoma (el cromosoma sexual X) al analizar el comportamiento genético de la mutación que produce la pigmentación blanca en el ojo compuesto de la mosca del vinagre, *Drosophila melanogaster*. Posteriormente su colaborador Bridges (1916) utilizó el fenómeno de la no-disyunción para ratificar la inferencia de Morgan, demostrando la relación entre la mutación *vermilion* (bermellón) y el cromosoma X. Por otro lado, Sturtevant (1913), también del grupo de Morgan, obtuvo la primera evidencia de la ordenación lineal de los genes sobre los cromosomas, construyendo el primer mapa de ligamiento correspondiente a seis genes del cromosoma X de *Drosophila melanogaster*. Las conclusiones de los primeros trabajos de la escuela de Morgan, que confirmaban la teoría mendeliana de la herencia, fueron expuestos en forma de libro en 1915 (Morgan *et al.*, 1915). En 1933, Morgan recibió el premio Nobel “por su descubrimiento en relación con el papel que desempeñan los cromosomas en la herencia”.

Por último, el tercer punto de la teoría cromosómica de la herencia –la relación entre el fenómeno citológico de intercambio entre cromosomas homólogos y el fenómeno genético de la recombinación– fue demostrado simultáneamente en 1931 en *Drosophila* (Stern, 1931) y en maíz (Creighton and McClintock, 1931). El intercambio citológico entre cromosomas homólogos se produce mediante el fenómeno del *sobrecruzamiento* o *crossing over* que ocurre durante la fase de paquitena de la meiosis. Aquí cabe señalar la importante contribución de Barbara McClintock en el desarrollo de la Citogenética y cuyas investigaciones en el comportamiento de los cambios cromosómicos estructurales le llevó a postular proféticamente a finales de la década de los cuarenta y principios de los cincuenta (McClintock, 1948, 1949, 1950, 1951, 1957) la existencia de los *elementos genéticos móviles*, que le valieron el premio Nobel en 1983, como veremos después.

El desarrollo posterior de la teoría cromosómica de la herencia condujo al nacimiento de una nueva ciencia –la Citogenética– que, a semejanza de la Genética de la que deriva en hibridación con la Citología, me llevó a definirla como “la ciencia que estudia el

cromosoma –el material hereditario organizado- bajo cualquier nivel o dimensión” (Lacadena, 1995b, 1996).

En relación con la división celular que asegura la conservación de la información genética en los organismos pluricelulares, hay que señalar que, en 2001, la Asamblea Nobel del Instituto Karolinska decidió conceder el Premio Nobel de Fisiología y Medicina al investigador norteamericano Leland H. Hartwell y a los británicos R. Timothy Hunt y Paul M. Nurse por sus descubrimientos de “los reguladores clave del ciclo celular”. Una vez más, la complementación de los enfoques genético y bioquímico ha sido fundamental para llegar al conocimiento de cómo se regula el ciclo de división celular. La aportación científica de los tres investigadores galardonados se enmarca dentro de la pregunta ¿cómo se transmiten los genes?, tal como se indica en el [CUADRO 4.1](#).

Para mí, como investigador citogenético que he dedicado más de 30 años de mi vida al estudio del comportamiento cromosómico, me complació enormemente la concesión de este premio Nobel a las investigaciones en torno a un tema tan clásico en la Biología y la Genética como es el ciclo celular (ver Lacadena, 1996). Lo crucial fue el paso de la investigación citológica descriptiva al análisis genético y bioquímico del comportamiento cromosómico.

Como señalaba el Profesor Agustín Zapata en la sesión científica de la Real Academia Nacional de Farmacia que conmemoraba los premios Nobel 2001, las aportaciones de los científicos galardonados sentaron las bases conceptuales del ciclo celular, que pueden resumirse en los siguientes puntos: 1) el ciclo celular puede considerarse como una secuencia de acontecimientos organizados temporalmente, 2) el inicio de cada uno de ellos es consecuencia de la finalización de los anteriores, 3) la relación entre unos acontecimientos y otros se establece directamente o a través de algún tipo de señales, 4) la necesidad de “conocer” la finalización de una etapa para comenzar la siguiente conlleva la existencia de controles a lo largo del ciclo, y 5) ciertos acontecimientos 31osibi como limitantes para la progresión del ciclo.

Leland H. Hartwell obtuvo más de cien mutantes en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* que bloqueaban el ciclo celular en distintas fases del mismo; por ejemplo, “start”, el producto del gen *CDC28*, estaba implicado en el comienzo de la replicación del ADN (Reed *et al.*, 1985). Además, fue fundamental la aportación de Hartwell sobre la existencia

de los llamados “*checkpoints*” que impiden a las células pasar a una nueva fase del ciclo si no se ha concluido la anterior (Hartwell y Weinert, 1989).

Por su parte, Paul Nurse, trabajando con la levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe*, obtuvo mutantes que controlan el ciclo celular; por ejemplo, identificó el gen *cdc2* que codifica para la proteína p34 y es esencial para el curso normal de la mitosis (Nurse and Bissett, 1981). Este gen es similar al gen *CDC28* que unos años después descubriría Hartwell en la levadura de gemación *S. cerevisiae* antes mencionado (Reed *et al*, 1985). Estos genes (y la proteína quinasa para la que codifican) han sido muy conservados en la evolución, habiéndose demostrado, incluso, que en el genoma humano hay un gen homólogo al *cdc2* (el *CDC2*, *Hs*) capaz de realizar en células mutantes de *Schizosaccharomyces pombe* la función del gen *cdc2* que falta (Lee and Nurse, 1987, 1988).

La *p34* es una fosfoproteína de 34 Kd que constituye la subunidad catalítica de una proteína con actividad serina/treonina quinasa inductora de la mitosis, conocida inicialmente como *MPF* (*factor promotor de la maduración*, después llamado *factor promotor de la mitosis*) y actualmente como quinasa de la *fase M*. La otra subunidad principal (subunidad reguladora) está constituida por las ciclinas: proteínas de unas 45 Kd de varias clases que se acumulan en la interfase y son degradadas al final de la mitosis, como fue demostrado por el tercer galardonado con el premio Nobel 2001 Tim Hunt en huevos fecundados de anfibios y erizos de mar (Evans *et al.*, 1983). En definitiva, el ciclo celular está regulado por distintos complejos Cdk-ciclinas que controlan el inicio de las fases S y M. El número de ciclinas identificadas en eucariontes superiores e inferiores es variable.

Como ha sucedido otras veces, en esta ocasión quedó injustamente fuera de la concesión del premio Nobel Yusui Masui que fue quien inició los primeros estudios sobre la existencia en la *fase M* del factor regulador *MPF* antes mencionado mediante experimentos de fusión celular y de microinyección. Así, Masui demostró que la microinyección del *MPF* procedente de oocitos del anfibio *Xenopus* detenidos en metafase inducía a otros oocitos que estaban bloqueados en el estadio *G₂/profase* a entrar en la metafase meiótica (Masui and Markert, 1971). Dicho factor, como se ha indicado anteriormente, estaba compuesto por dos proteínas: una ciclina y una proteína de 34 Kd idéntica al producto del gen *cdc2* descrito por Nurse. Dado que, salvo premios otorgados

a colectivos, las normas de la institución Nobel prohíben otorgar un mismo premio a más de tres investigadores, ello posiblemente fue la causa de la marginación del descubrimiento pionero de Masui.

En este contexto, permítaseme que haga un comentario adicional en torno a alguna de las investigaciones realizadas por Paul Nurse, uno de los galardonados con el premio Nobel 2001. En el ciclo cromosómico celular se produce normalmente la alternancia de las fases S (síntesis del ADN) y M (mitosis o segregación cromosómica); es decir, la sucesión alternada...- S - M - S - M -... En 1994, Sergio Moreno y Paul Nurse identificaron en la levadura de fisión (*Schizosaccharomyces pombe*) el gen *rum1* (por *replication uncoupled from mitosis*) que juega un importante papel como regulador de la replicación del ADN en relación con la mitosis: la sobreexpresión del gen *rum1* da lugar a la dos rondas sucesivas de síntesis del ADN sin pasar por una mitosis intermedia (S - S, *endorreduplicación, duplocromosomas*), mientras que la delección de dicho gen o la ausencia de su función permite a la célula pasar por dos rondas sucesivas de segregación cromosómica (M - M) sin que haya un periodo de síntesis (S) entre ellas; es decir, lo que sucede normalmente en la meiosis. Este comportamiento del gen *rum1* sugiere que hay dos mecanismos que controlan la mitosis como respuesta a la situación de la replicación del ADN: un mecanismo que impide la entrada en mitosis a las células que no han pasado por el punto *start* y, por tanto, no han replicado su ADN; el otro mecanismo es el responsable de impedir que entren en mitosis las células que, habiendo pasado por el punto *start*, aún no han completado la fase S de replicación. Pues bien, mi satisfacción personal en este punto es que en 1969 (Lacadena, 1969) y en 1979 (Pérez de la Vega y Lacadena, 1979) tuve la oportunidad de describir la existencia de *haplocromosomas* en plantas de centeno aloplásmico (las células tienen el citoplasma del trigo y el núcleo de centeno). Estos haplocromosomas se caracterizan por ser cromosomas metafásicos con un solo cromatidio; es decir, la alternancia de fases M - S se había sustituido por una alternancia M - M. Indudablemente, este comportamiento anómalo descrito citológicamente podría ser explicado hoy en términos de un gen homólogo al gen *rum1* identificado por Moreno y Nurse.

3.3. ¿Cómo y cuándo se expresan los genes?

El contenido del presente apartado está basado en escritos previos del autor (Lacadena, 1974, 1985, 1986, 1988, 1999). Contestaremos a ambas preguntas por separado:

1. ¿Cómo se expresan los genes?

Durante los primeros treinta o cuarenta años de existencia de la Genética, la investigación estuvo encaminada al conocimiento de lo que se podría llamar *Genética de la transmisión*; es decir, el análisis de los factores hereditarios en cuanto a su comportamiento mendeliano simple o complejo, en caracteres cualitativos o cuantitativos, a nivel individual o de población. Mediada la década de los treinta, agotada –valga la expresión– la Genética de la transmisión, los científicos genéticos de la época se plantearon la doble pregunta fundamental: ¿cuál es la naturaleza y el modo de acción de los genes? Esta doble problemática se abordó durante los veinte años siguientes, constituyendo la segunda etapa cronológica de la Genética (1940-1960) antes mencionada.

Aunque, en buena lógica científica, parecería que la contestación a la segunda cuestión debería estar condicionada al conocimiento previo de la naturaleza del material hereditario, sin embargo, los acontecimientos no se produjeron así. De hecho, la fundamental *hipótesis un gen-una enzima* propuesta por Beadle y Tatum en 1941 se adelantaba tres años a la identificación del ADN como material hereditario.

Como comentaré con cierta extensión más adelante, la regla de oro de la investigación científica implica tres requisitos: tener una pregunta importante y buscar su contestación en el material biológico apropiado y con las técnicas adecuadas. En el caso que nos ocupa, evidentemente la pregunta era esencial. Sin embargo, las especies biológicas hasta entonces más utilizadas en la investigación genética (*Drosophila*, ratón, maíz, cebada, etc.) eran demasiado complejas en su organización biológica para acometer las nuevas líneas de investigación. Por ello, se eligieron nuevos organismos con organización biológica más simple que los anteriores, de tal forma que los virus, las bacterias y los hongos desbancaron a *Drosophila* que, en ingeniosa frase de Dobzhansky, “ya no es la reina de la Genética, sino que ha pasado a la honorífica oscuridad de una reina fundadora”.

El tercer requisito que debería cumplirse de acuerdo con esa regla de oro de la investigación era el de utilizar una técnica adecuada. Para poder abordar el análisis del

funcionamiento de los genes era necesario cambiar los caracteres a estudiar. En los caracteres estudiados hasta entonces la manifestación externa de los caracteres o fenotipo, como expresión del genotipo, estaba demasiado alejada de éste en cuanto que suponía una compleja serie de procesos fisiológicos y de desarrollo difíciles de analizar. La idea genial de Beadle y Tatum fue la de pasar a estudiar caracteres cuyo fenotipo fuera fácilmente analizable en términos de procesos metabólicos y, por consiguiente, de reacciones químicas. Ello iba a suponer el nacimiento de la *Genética Bioquímica* como eslabón que había de unir dos ramas y dos épocas de la Genética: La *Genética de la transmisión de los caracteres* y la *Genética Molecular*. Volviendo a la regla de oro de la investigación, ahora se trataba de utilizar una metodología y técnica adecuadas; la metodología consistió en el análisis genético de las reacciones químicas. De hecho, en 1958 Beadle y Tatum fueron galardonados con el premio Nobel “por su descubrimiento de que los genes actúan regulando sucesos químicos definidos”.

Es digno de mención, sin embargo, que los primeros trabajos de Genética Bioquímica se adelantaron más de treinta años al planteamiento anterior: en 1902, Archibald Garrod, un médico inglés, indicaba que la alcaptonuria humana era una enfermedad hereditaria atribuible a una deficiencia en el metabolismo del nitrógeno; más tarde, demostraba que el determinismo se debía a un gen mendeliano recesivo que producía un fallo en alguna reacción metabólica catalizada enzimáticamente e introducía el término de “errores congénitos del metabolismo” para indicar este tipo de alteraciones enzimáticas determinadas genéticamente, dando así el título “Inborn Errors of Metabolism” al libro publicado en 1909.

El “caso Garrod” es el segundo ejemplo –el primero fue el de Miescher- de profundo olvido de un gran descubrimiento bioquímico en el campo de la Genética. Lo mismo que el trabajo de Miescher era conocido entre los bioquímicos, así también el de Garrod lo fue entre los médicos; sin embargo, su profundo significado conceptual no fue comprendido por los genéticos contemporáneos a pesar de que, incluso, el propio Bateson había ayudado a Garrod a hacer el análisis genético en los estudios de cuatro de tales errores metabólicos hereditarios: la alcaptonuria, el albinismo, la cistinuria y la pentosuria. Ciertamente, el significado genético que se derivaba de tales trabajos estaba implícito en las propias palabras de Garrod: “... en la alcaptonuria el fallo de rotura del anillo bencénico se extiende a los ácidos con grupos hidroxil en posición 2:5 distintos al ácido homogentísico... Esta

concepción de la anomalía localiza el error en la penúltima etapa del catabolismo de la fracción proteica aromática...”, y más adelante añade: “...Podemos, por tanto, concebir que la rotura del anillo benzénico en el metabolismo normal es el trabajo de una enzima especial... cuyo trabajo puede ser parcial o totalmente inhibido en la enfermedad”.

Aunque con posterioridad a Garrod muchos y muy cualificados genéticos (Cuénot, Bateson, Goldshmidt, Haldane, Muller, Bridges, Wright, etc.) hicieron sugerencias más o menos teóricas indicando que las enzimas estaban involucradas en la acción génica, sin embargo, el trabajo de Garrod fue mucho más explícito y más directamente basado en la evidencia experimental.

Los trabajos sistemáticos de Genética Bioquímica aparecieron en la década 1930-1940. En todos ellos se tomaban como fenotipos a analizar la pigmentación ya fuera de las flores ya del ojo compuesto de los insectos, especialmente *Drosophila*.

En el caso de la pigmentación de las flores, ya en 1940, al revisar los trabajos realizados, se llegaban a conclusiones tales como que: 1) las principales sustancias responsables de la coloración de las flores son las antocianinas, las antoxantinas y los carotenoides; 2) la producción de pigmentos está genéticamente controlada cualitativa y cuantitativamente; 3) modificaciones químicas del tipo oxidación, glicosilación, metilación, etc. Están determinadas por relaciones génicas simples.

Por la misma época, iniciaba Beadle, en colaboración primero con Ephrussi (Beadle and Ephrussi, 1937) y luego con Tatum, el estudio de la pigmentación del ojo compuesto de *Drosophila*, llegando a la conclusión de que las mutaciones *vermilion* y *cinnabar* bloqueaban de alguna manera la transformación del triptófano en formilquinurenina y la de ésta en hidroxiquinurenina, respectivamente. Hoy día se sabe que la enzima codificada por el locus *vermilion* es la triptófano pirrolasa y la codificada por el locus *cinnabar* la quinurenina-3-hidroxilasa.

Ante estos resultados esperanzadores, Beadle y Tatum decidieron continuar sus investigaciones en otros organismos más sencillos como son los hongos y, en concreto, utilizaron el moho del pan, *Neurospora crassa*. Continuaron trabajando en la ruta del triptófano utilizando gran cantidad de mutantes bioquímicos (*mutantes nutricionales*) inducidos por rayos X. Estudiando la ruta metabólica del triptófano desde el ácido antranílico hasta el ácido nicotínico pudieron deducir la existencia de diferentes genes que

controlaban el proceso, llevándoles a enunciar en 1941 su teoría “un gen-una enzima”, de fundamental trascendencia para el ulterior desarrollo de la Genética (Beadle and Tatum, 1941; Beadle, 1946).

Cuando Beadle recibió el premio Nobel en 1958 dijo en su discurso: “...Primero en *Drosophila* y luego en *Neurospora*, nosotros hemos redescubierto lo que Garrod había visto tan claramente hace tantos años. Nosotros conocíamos su trabajo y éramos conscientes de que poco, si algo, habíamos añadido en principio. Estábamos trabajando con un organismo más favorable y éramos capaces de producir, casi a voluntad, errores congénitos del metabolismo para casi cualquier reacción química cuyo producto podía ser suministrado a través del medio. Así, fuimos capaces de demostrar que lo que Garrod había mostrado para unos pocos genes y unas pocas reacciones químicas en el hombre, era cierto para muchos genes y muchas reacciones en *Neurospora*”. Se había hecho justicia con Garrod.

Una vez aceptada la hipótesis “un gen-una enzima” quedaba por resolver si la relación entre ambas unidades (genética y fisiológica, respectivamente) consistía simplemente en que el gen permitía o impedía la actividad de la enzima o si, por el contrario, existía algún tipo de *relación informacional* entre el gen y la enzima; es decir, si el propio gen llevaba información sobre la estructura y, por consiguiente, especificidad de la enzima (ver Lacadena, 1988).

El conocimiento de las propiedades de las proteínas, tales como que la movilidad electroforética de la hemoglobina normal y falciforme (y, por tanto, su estructura) está bajo control genético (Pauling *et al.*, 1949) que sus propiedades específicas están determinadas por la secuencia definida de aminoácidos (Sanger, 1955, en la insulina) y que la mutación *falciforme* sólo supone el cambio de un aminoácido en la hemoglobina normal (Ingram, 1956) llevó a la conclusión de que un gen podía determinar la estructura específica de una proteína.

Todos estos datos, unidos al conocimiento que ya se tenía sobre la estructura del ADN, permitieron a Crick sugerir en 1958 su genial *hipótesis de la secuencia* enunciada en los términos siguientes: “existe una relación entre la ordenación lineal de los nucleótidos en el ácido nucleico y la de los aminoácidos en las proteínas”. La hipótesis era tan sugestiva y, por otro lado, tan congruente con los datos genéticos conocidos hasta la fecha que nadie dudó de ella y se aceptó, sin ningún tipo de reservas, como punto de partida para ulteriores investigaciones, las cuales culminaron con el descubrimiento de los fenómenos genéticos

incluidos en lo que puede denominarse *código genético* en su más amplio sentido; es decir, el “conjunto de regularidades o principios de coordinación según los cuales la *información genética* está *codificada* en el *ADN*, transcrita a un *ARN mensajero* en el curso de la *transcripción* y traducida a *proteínas* con secuencias específicas de 20 aminoácidos mediante el proceso de *traducción*”. De hecho, la demostración experimental de la “hipótesis de la secuencia” tuvo lugar seis años más tarde (“principio de colinealidad”, Yanofsky, Sarabhai) cuando ya estaba prácticamente finalizada la investigación fundamental en torno al código genético.

Decíamos antes que la Genética Bioquímica era el nexo entre la Genética de la Transmisión y la Genética Molecular. Ciertamente, podríamos decir que la Genética Bioquímica se transforma en Genética Molecular cuando se establece la correspondencia colineal entre las estructuras moleculares de los genes y las proteínas para las que codifican.

Admitida, pues, la “hipótesis de la secuencia”, se plantearon dos cuestiones fundamentales: 1) ¿Existe una *clave* de equivalencia que relaciona ambas estructuras lineales, es decir, la ordenación lineal de bases en el ADN con la de aminoácidos en la proteína; 2) ¿por qué medios llega a traducirse a una estructura química de naturaleza proteica la información genética contenida en la estructura química del material hereditario que es el ADN? La primera cuestión implicó el estudio de las *características* y el *desciframiento* de la *clave genética*. La segunda cuestión llevó consigo el análisis de los *procesos genéticos* de la *síntesis de proteínas*, a saber: la *transcripción* y la *traducción*.

El primer concepto esencial de cómo debía intentar resolverse el problema de la clave genética fue propuesto por el astrofísico Gamow (1954): se trata de pasar de un lenguaje de cuatro letras –las bases nitrogenadas del ADN- a otro de veinte –los aminoácidos esenciales que componen las proteínas. Así –decía Gamow- “las propiedades hereditarias de cualquier organismo pueden ser caracterizadas por un largo número escrito en un sistema de cuatro dígitos”.

Las *características de la clave* genética (tripletes, código degenerado y sin superposición, lectura sin comas) fueron establecidas por Crick y colaboradores (1961) recopilando tanto sus propias investigaciones como las de otros investigadores.

El *desciframiento de la clave* –esto es, la asignación de un aminoácido a cada triplete o codón- se llevó a cabo gracias principalmente a los grupos de trabajo dirigidos por Severo

Ochoa, Marshall W. Nirenberg y Har Gobind Khorana. En esencia, el planteamiento experimental consistió en producir ARNs sintéticos que utilizaron como mensajeros artificiales en sistemas *in vitro* con todos los elementos necesarios para inducir la síntesis de polipéptidos. De la comparación entre las secuencias de bases de los ARN mensajeros artificiales y los aminoácidos presentes en los polipéptidos sintetizados se pudieron descifrar los diferentes codones.

La aportación fundamental de Ochoa fue el descubrimiento en 1955 de una enzima –la *polirribonucleótido fosforilasa*– que cataliza la síntesis de ARN a partir de ribonucleósidos difosfatos sin necesidad de un molde previo (Grunberg-Manago and Ochoa, 1955). Por tanto, con esta enzima se podían sintetizar los ARN mensajeros artificiales.

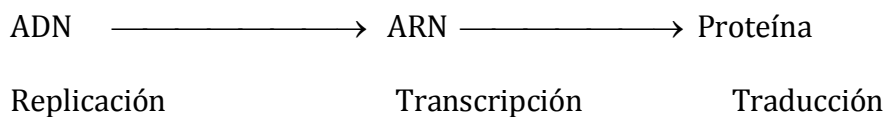
Por otro lado, la aportación del grupo de Nirenberg (Matthaei and Nirenberg, 1961) consistió en la obtención de un sistema acelular estable donde producir la síntesis de proteínas *in vitro*. Así, en 1961, Nirenberg y Matthaei consiguieron sintetizar polipéptidos añadiendo un ARN de secuencia conocida a un sistema acelular estable de *Escherichia coli* desprovisto de ARN mensajero, pero en el que estaban todos los demás elementos biológicos (aminoácidos, ARN transferente, ribosomas, enzimas, etc.) necesarios para llevar a cabo un proceso de síntesis de proteínas. La utilización de *homopolímeros* y *copolímeros* como ARN mensajeros artificiales permitió identificar los primeros codones.

Posteriormente se llevó a cabo un tercer ataque al problema del desciframiento de la clave utilizando como mensajeros artificiales *polímeros de secuencia conocida*. Esta técnica, puesta en práctica inicialmente por el grupo de Ochoa, tuvo importantes dificultades de tipo experimental hasta que fue utilizada por el grupo de Khorana (Khorana, 1965; Nishimura *et al.*, 1965a y b, etc.), quienes, a diferencia de los métodos abordados anteriormente, utilizaban un ARN sintetizado químicamente y no por medios enzimáticos.

Con las técnicas experimentales mencionadas se llegó a descifrar en un lapso de tiempo de cinco años (1961-1966) 61 tripletes que codificaban para los 20 aminoácidos. Los tres codones que faltaban por descifrar (UAA, UAG y UGA) fueron identificados posteriormente como codones de terminación. A Ochoa le concedieron el premio Nobel en 1959 “por su descubrimiento de los mecanismos en la síntesis biológica del ácido ribonucleico” y a Nirenberg y Khorana en 1968 “por su interpretación del código genético y su función en la síntesis de proteínas”. Estos dos últimos compartieron el premio con Robert W. Holley cuyas investigaciones habían permitido conocer la estructura del ARN

transferente, *ARNt* (Holley *et al.*, 1965a y b; ver la nota necrológica por Rich, 1993) que juega un importante papel en el proceso de traducción transfiriendo a los aminoácidos (complejo de transferencia, aminoácido-ARNt) para que se incorporen en el lugar correcto en el polipéptido naciente de acuerdo con los codones presentes en el ARN mensajero.

El planteamiento de la “hipótesis de la secuencia” de Crick condujo al desciframiento de la clave del código genético. En otras palabras, la información genética consiste en la secuencia de bases en el ADN. Sin embargo, la información contenida en el ADN de los cromosomas se expresa en la síntesis de proteínas que tiene lugar en el citoplasma de la célula. Por ello, desde un principio se tuvo la idea clara de que en el flujo de información ADN→ proteína tenía que haber una molécula intermediaria que transcribiese fielmente la información contenida en el ADN. Fueron Jacob y colaboradores quienes postularon, primero, y demostraron experimentalmente su existencia, después (Brenner *et al.*, 1961): se trataba de una molécula de ácido ribonucleico que denominaron ARN mensajero (*ARNm*) (ver la autobiografía de Jacob, 1987 sobre el tema). Es decir, el esquema general de lo que es en esencia nuestro sistema vital desde el punto de vista genético queda expresado en lo que Crick (1970) denominó *dogma central de la biología molecular*:



La información genética está contenida en la secuencia de bases del ADN, que se conserva gracias a su propiedad de *replicación*. Mediante el proceso de *transcripción* la información es transferida a una molécula monocatenaria de ARN (el *ARNm*). Posteriormente, el mensaje contenido en forma de ARN es traducido a proteína en el proceso de *traducción*.

a) La transcripción

El proceso de *transcripción* es realizado por enzimas específicas: las ARN polimerasas o transcriptasas. Así como en las bacterias sólo existe un tipo de ARN polimerasa, en los eucariontes hay tres clases, denominadas ARN pol I, ARN pol II y ARN pol III que se encargan, respectivamente, de la transcripción del ARN ribosomal, del ARN transcrito por genes que codifican para proteínas y de los ARN de tamaño pequeño (*ARNt*, *ARN5S*, etc.).

En 2006 se otorgó el premio Nobel de Química a Roger D. Kornberg (hijo del también laureado en 1959 Arthur Kornberg) “por sus estudios de la base molecular de la transcripción eucariótica”. Kornberg, que había iniciado su carrera científica como estudiante postdoctoral en el MRC de Cambridge, UK, trabajando con el laureado Nobel Aaron Klug en el estudio de la estructura de la cromatina, demostró en 1974 que las histonas H3 y H4 forman un tetrámero del tipo $(H3)_2(H4)_2$ (Kornberg y Thomas, 1974) y propuso, asimismo, que el nucleosoma es la unidad básica de la cromatina, estando formado por un octámero de histonas y 200 pb de ADN (Kornberg, 1974).

Al regresar a Standford, USA, Kornberg decidió cambiar de línea de investigación adentrándose en el tema de transcripción en eucariontes. Aplicando a la perfección la regla de oro de la investigación (pregunta importante, material biológico y técnica experimental, ver más adelante el Capítulo 4), Kornberg eligió como organismo eucariótico modelo la levadura, *Saccaromyces cerevisiae*, siendo capaz de desarrollar un sistema de transcripción *in vitro* idóneo para llevar a cabo su propósito (Lue y Kornberg, 1987; Sayre *et al.*, 1992). Mediante la técnica de análisis cristalográfico con rayos X, en el año 2001 Kornberg y colaboradores (Cramer *et al.*, 2001; Gnatt *et al.*, 2001) estudiaron la estructura del complejo de transcripción (ARN pol II, ADN y ARN sintetizado) a un nivel de alta resolución (2,8 y 3,3 Å). Estudios posteriores de nuevas estructuras cristalizadas del complejo ARN pol II – ADN – ARN – nucleótidos – proteínas han permitido a Kornberg y colaboradores realizar una interpretación dinámica del proceso de transcripción.

El progreso de la Genética Molecular había llevado al conocimiento de que los genes son fragmentos más o menos largos de ADN y que la información genética consiste en la secuencia de bases que contienen. Sin embargo, a partir de 1977 se demostró que aunque se transcribe todo el ADN de un gen no todo el ARN sintetizado aparece en forma de ARN mensajero maduro y, por tanto, no es expresado en términos de secuencia de aminoácidos en el polipéptido sintetizado. Es decir, dentro de un gen puede haber *secuencias interpuestas* o *intrones*, definiéndose el intrón como una secuencia inerte en el ADN del gen. En contraposición, la secuencia del ADN que se expresa –es decir, que se traduce, en su caso, en aminoácidos- se denomina *exón*.

En 1977 Phillip A. Sharp y Richard J. Roberts (Berge *et al.*, 1977; Chow *et al.*, 1977) demostraba mediante microscopía electrónica que el ARNm y el ADN del gen correspondiente de adenovirus no coincidían con exactitud en la molécula híbrida ADN-

ARN, de manera que se formaban lazos monocatenarios de ADN, indicando claramente que había segmentos de ADN del gen que no estaban representados en el ARNm maduro y, por tanto, en la proteína para la que dicho gen codificaba. Este descubrimiento ponía de manifiesto que el modelo universal de gen como un fragmento continuo de ADN ya no era válido: acababa de nacer un nuevo modelo de *gen discontinuo* o *gen en piezas*.

La importancia del descubrimiento la describe muy bien Thomas R. Cech (también premio Nobel como comentaremos más adelante) cuando relata la sensación que produjeron las comunicaciones presentadas por ambos grupos de investigación en el congreso de Cold Spring Harbor en junio de 1977: “La audiencia –dice Cech- estaba atónita. Era uno de esos momentos en los que el mundo se pone cabeza abajo”. En 1993, Sharp y Roberts recibían el premio Nobel “por el descubrimiento de los genes discontinuos”.

Inmediatamente después de la publicación en 1977 de los trabajos de Sharp y de Roberts se comprobó que la estructura discontinua de los genes también se da en los organismos eucarióticos. Por ejemplo, el gen de la β -globina del ratón y del conejo tiene dos intrones, el gen de la ovoalbúmina del pollo tiene 7 exones y 7 intrones, el de la seroalbúmina de rata tiene 14 exones y 13 intrones, el del factor VIII humano tiene 26 exones, etc.

Ciertamente, el descubrimiento de la existencia de “genes en piezas” fue revolucionario. Algunos autores le han dado un significado evolutivo al considerar que los exones codifican para unidades o dominios funcionales de las proteínas que pueden servir para una más rápida evolución de las mismas. Algo así como si fuera una construcción evolutiva mediante módulos o piezas prefabricadas. Por deformación profesional debo confesar que en muchas ocasiones, cuando escribo trabajos de revisión y voy tomando frases o párrafos de mis propios escritos, me imagino que estoy manejando mis “exones intelectuales”, valga la expresión.

La existencia de intrones y exones en la estructura del gen implica que el ARN transcrito inicialmente por el gen tiene que eliminar las regiones correspondientes a los intrones y unir los extremos rotos para recomponer la molécula continua de ARN que ha de constituir el ARN mensajero maduro que lleva la información correspondiente a los exones. Es el mecanismo conocido como rotura y empalme (*splitting and splicing*) en el que el

propio Sharp ha seguido interesado (Sharp, 1981, 1985, 1987, y su propia Conferencia Nobel).

Precisamente, el estudio de cómo podría producirse la rotura y empalme les llevó a Thomas R. Cech en 1981 y a Sidney Altman en 1983 a demostrar la actividad catalítica del ARN: el primero estudiando el proceso de maduración del ARN ribosomal (*ARNr*) del protozoo ciliado *Tetrahymena thermophila* (Cech *et al.*, 1981; Kruger *et al.*, 1982; Zaug and Cech, 1986) y el segundo demostrando que el componente ARN de la ribonucleasa *P* es la subunidad catalítica responsable de la escisión de parte del ARN en el proceso de maduración de la molécula de ARN transferente en la levadura (Guerrier-Takada *et al.*, 1983; Altman *et al.*, 1986). En 1989, Altman y Cech recibieron el premio Nobel de Química “por su descubrimiento de las propiedades catalíticas del ácido ribonucleico (ARN)”. Aquí podría resaltar que los resultados de ambos investigadores estuvieron en su día en contra del “orden científico establecido” (el *establishment* científico) –como lo fue en su tiempo la identificación del ADN como material hereditario frente a las proteínas- puesto que hasta entonces la actividad enzimática era una exclusiva de las proteínas.

Finalmente, en relación con el nuevo modelo estructural de gen discontinuo, y teniendo en cuenta que se han descrito fenómenos de *splicing* alternativo y de *trans-splicing*, queda en entredicho la idea genética fuertemente arraigada de un gen o un cistrón – un polipéptido frente a la posibilidad de un cistrón – varios polipéptidos o varios cistrones – un polipéptido. Todo ello hace más difícil la definición de gen.

b) *La traducción.*

En 2009, Venkatraman Ramakrishnan, Thomas A. Steitz y Ada E. Yonath recibieron el Premio Nobel en Química “por los estudios sobre la estructura y función del ribosoma” en la traducción. Como resaltaba la propia institución Nobel al hacer público el premio, el ADN y el ARN son moléculas portadoras de la información genética, pero con ellas solas no habría vida porque son las proteínas las que construyen y controlan la vida. Es en los ribosomas donde se produce la síntesis de las proteínas.

El ribosoma bacteriano (70S) es una ribonucleoproteína que consta de dos subunidades, grande (50S, 1.500.000 Da) y pequeña (30S, 800.000 Da). La subunidad grande (50S) está constituida por unas 33 proteínas diferentes y por dos moléculas de ARN (ARNr 23S, 2.900b y ARNr 5S, 120 b) y la subunidad pequeña (30S) esta formada por

20 proteínas y una molécula de ARN (ARNr 16S, 1.600 b). Ambas subunidades están separadas hasta que se unen al iniciarse el proceso de traducción, al término del cual vuelven a disociarse. Desde el punto de vista funcional, en el ribosoma hay tres sedes de unión al ARNt: la sede A (aminoacil) de entrada del complejo de transferencia que lleva el aminoácido correspondiente a un nuevo codón, sede P (peptidil) donde se realiza el enlace peptídico entre el último aminoácido de la cadena peptidil-ARNt_{n-1} y el nuevo aminoácido recién incorporado en el aminoacil-ARNt_n y la sede E (*exit*, salida) por donde se libera el ARNt_{n-1}.

Resumidamente, además de los ribosomas, los elementos que intervienen en el proceso de traducción en los procariontes son los aminoácidos y los ARN transferentes correspondientes (ARNt, unas 80 b, extremo CCA 3' donde se une el aminoácido, anticodón) a los que se unen por un enlace éster en el extremo 3' gracias a las aminoacil-ARNt sintetasas formando los complejos de transferencia (aminoacil-ARNt), el ARN mensajero (ARNm) con la secuencia líder Shine-Dalgarno de iniciación y codones de iniciación (AUG) y terminación (UAA, UAG, UGA) además de los codones intermedios que codifican para los diferentes aminoácidos que habrán de formar la cadena polipeptídica sintetizada, factores de iniciación (IF1, IF2 GTPasa, IF3), factores de elongación (EF-T_s, EF-T_u GTPasa, EF-G GTPasa o translocasa), actividad peptidil transferasa, factores de liberación (RF₁, RF₂), factores de disociación, fuentes de energía (ATP, GTP) y Mg⁺⁺.

La dirección de lectura del ARNm es 5' → 3' y la de síntesis del polipéptido NH₂ → COOH. Las etapas del proceso de traducción son: iniciación, elongación y terminación. El ribosoma cataliza dos procesos químicos que implican la formación de enlaces covalentes, a saber: la formación del enlace peptídico entre los sucesivos aminoácidos que se van incorporando en la síntesis del polipéptido (fase de elongación) y la hidrólisis del enlace éster en la fase de terminación de la síntesis.

En Biología, el binomio estructura-función implica que cuando existe una determinada estructura es para realizar una cierta función y, recíprocamente, para que se lleve a cabo una función es necesaria una estructura adecuada. Por eso, esta breve introducción al tema lleva como título "Estructura atómica del ribosoma: estructura y función en el corazón de la Genética". Además, el conocimiento de ese dualismo estructura-función del ribosoma tiene una aplicación clínica muy importante porque muchos de los antibióticos que se utilizan hoy en día actúan bloqueando alguna de las

funciones específicas de los ribosomas bacterianos impidiendo su funcionamiento normal y, en consecuencia, curando las enfermedades provocadas por las infecciones bacterianas.

Como señalaba el informe de la Real Academia de Ciencias de Suecia (Ehrenberg, 2009), durante décadas fue desconocida la manera en que el ribosoma realizaba los mencionados mecanismos químicos de estas etapas de reacción covalente. Hubo que esperar a la posibilidad de estudiar en alta resolución las estructuras cristalinas de las subunidades ribosomales, los complejos funcionales del ribosoma y el propio ribosoma en su totalidad (70 S).

Fue la Dra. Ada E. Yonath quien abrió el camino logrando en los primeros años de la década de los ochenta la cristalización y análisis tridimensional de la subunidad grande (50S) de la bacteria termófila *Geobacillus stearothermophilus* (Yonath *et al.*, 1980, 1984). No obstante, en estos y otros trabajos de la década los cristales obtenidos difractaban a una resolución en torno a los 10Å que todavía no permitía la construcción de un modelo atómico detallado. Tendrían que pasar todavía 10 años hasta que los grupos de los otros dos galardonados Thomas Steitz (Ban *et al.*, 1998, 1999, 2000) y Venkatraman Ramakrishnan (Clemons *et al.*, 1999; Kimberly *et al.*, 2000) llegaban a unos niveles de resolución de 5Å, 4Å e inferiores a 3 Å. Obviamente, también el grupo de Yonath alcanzó el nivel de resolución adecuado (Schlunzen *et al.*, 2000; Harms *et al.*, 2001).

Una vez conocida la estructura de las subunidades ribosómicas, el paso siguiente fue analizar los mecanismos que aseguraban la exactitud de la selección de los ARNt (es decir, de los respectivos complejos de transferencia) y la realización del enlace peptídico durante la fase de elongación. El mecanismo de interacción codón-anticodón en la subunidad 30S que asegura la exactitud del proceso de lectura por el ribosoma del mensaje genético contenido en el ARN mensajero fue analizado por Ramakrishnan y colaboradores (Ogle *et al.*, 2001, 2002; Ogle y Ramakrishnan, 2005).

En cuanto Steitz y colaboradores (Ban *et al.*, 2000) obtuvieron la estructura de la subunidad 50S en alta resolución (4.5 Å) se planteó el estudio de los mecanismos mediante los que el ribosoma cataliza la formación del enlace peptídico transfiriendo el péptido naciente (peptidil-ARNt) de la sede P a la sede A (aminoacil-ARNt) (Nissen *et al.*, 2000). En 2004, otros grupos de investigación hicieron importantes contribuciones demostrando, por un lado, la dependencia de la temperatura de la tasa de transferencia (Sievers *et al.*, 2004) y, por otro lado, la demostración cuantitativa de la naturaleza

esencial del grupo 2'-OH de A76 del peptidil-ARNt con el componente peptidil unido al O3' de A76 (Weinger *et al.*, 2004).

Basándose en los datos estructurales previamente conocidos y utilizando métodos computacionales moleculares, Trobo y Åkvist (2006, 2006) propusieron un modelo del mecanismo de formación del enlace peptídico en el ribosoma: el grupo α -amino del aminoacil-ARNt en la sede A ataca al enlace éster del peptidil-ARNt en la sede P.

Como señalaba Ehrenberg (2009) en su revisión Nobel, el modelo estructural de la subunidad 50S descubierto por Steitz y colaboradores –con la publicación en 2005 de su “joya de la corona” (Schmeing *et al.*, 2005)– fue la base fundamental para clarificar cómo el ribosoma cataliza la formación de los enlaces peptídicos en la etapa de elongación de la cadena polipeptídica.

Otros aspectos importantes en el proceso de la síntesis de proteínas, como son el papel de los factores de liberación (RF1 y RF2) que leen los codones de terminación (UAA, UAG, UGA), fueron analizados en 2008 por los grupos de Noller y de Ramakrishnan analizaron con alta resolución las estructuras de los complejos correspondientes del ribosoma 70S con el factor RF1 (Laurberg *et al.*, 2008) y RF2 (Weixlbaumer *et al.*, 2008; Korostelev *et al.*, 2008). Asimismo, por un lado, el grupo de Steitz analizó el comportamiento de LepA, que es una GTPasa que cataliza la translocación inversa tanto en el ARNt como en el ARNm y, por otro lado, al analizar en alta resolución la estructura del complejo ribosoma-factor EF-P sugirieron que dicho factor podría facilitar la colocación del complejo de transferencia fMet-ARNt para la rápida formación del primer enlace peptídico una vez iniciado el proceso de traducción.

En 2006, el grupo de Ramakrishnan analizó las interacciones del ARNt y ARNm con el ribosoma 70S en la fase de pre-translocación (Selmer *et al.*, 2006) y, finalmente, en 2009, demostraron que las proteínas L27 y L16 de la subunidad 50S del ribosoma estabilizan los extremos CCA de las dos moléculas de ARNt que participan en la reacción peptidil-transferasa, sugiriendo que ambas proteínas intervienen en el mecanismo catalítico de la formación del enlace peptídico (Voorhees *et al.*, 2009). En otras palabras, que aunque el ARNt y el ARNr actúan como los principales catalizadores de la formación del enlace peptídico, no se puede descartar que proteínas ribosomales puedan jugar también un papel importante.

La revisión de Ehrenberg (2009) terminaba con el siguiente colofón:

“Al principio se creía que la proteína ribosomal llevaba a cabo las acciones catalíticas del ribosoma. Luego se pensó que el catalizador era el ARN ribosomal. Ahora sabemos que la formación del enlace peptídico en el ribosoma bacteriano y quizá en los ribosomas de todos los organismos está catalizado por el ARN y por la proteína ribosomal, así como por el grupo 2'-OH del substrato peptidil-ARNt en la sede P del ribosoma. [Desde el punto de vista evolutivo], esta triada catalítica puede reflejar un punto de partida más complejo de la ruta hacia el actual mundo de las proteínas que un puro mundo del ARN”.

Este colofón de matiz evolutivo en torno al papel del ARN en el origen de la vida nos lleva a recordar el comentario que he hecho anteriormente en relación con Jack W. Szostak galardonado con el Premio Nobel en Fisiología o Medicina 2009. Por ello, me permito recoger aquí las palabras que incluí en un cierto pasaje de mi discurso de ingreso en la Real Academia Nacional de Farmacia (Lacadena, 1995) y que repetiré más adelante en el apartado 3.5:

“Aunque, nuestro conocimiento de la transición prebiótica al ‘mundo del ARN’ está plagado de incertidumbres por falta de datos experimentales, es hora de situar la evolución del ARN en el contexto de la química que le precedió y de la biología que le siguió. Por ello pienso que, en términos de evolución del aparato genético, habría que gritar, parafraseando la antigua fórmula de proclamación de los reyes en la monarquía francesa: el ADN ha muerto, ¡viva el ARN!

2. ¿Cuándo se expresan los genes?

Hasta ahora, hemos hecho referencia a cómo se expresan los genes. Pasemos, pues, a considerar *cuándo se expresan*; es decir, cómo se regula la expresión del material hereditario. Haremos referencia, en primer lugar, a los mecanismos de regulación y, en segundo lugar, al control genético del desarrollo.

1. Mecanismos de regulación

1.1. Regulación transcripcional: El modelo del operón

En términos generales, puede aceptarse que todas las células de un organismo pluricelular contienen la misma información genética nuclear recibida a través de los mecanismos citológicos (mitosis) que aseguran la conservación y transmisión de un

patrimonio hereditario idéntico a las células hijas en cada proceso de división celular. Sin embargo, en un organismo pluricelular las células se diferencian y especializan en funciones determinadas de manera que, por ejemplo, los sistemas enzimáticos presentes en un hepatocito no tienen que ser los mismos que los de un miocito. O, incluso, en un organismo unicelular como es una bacteria o una levadura la producción enzimática no es continua, sino que está en relación con las necesidades celulares. Es un principio de economía celular que la producción de una enzima determinada venga regulada por algún mecanismo que actúe de acuerdo con las circunstancias cambiantes de la célula.

Dentro de la fisiología celular hay algunos procesos que suceden de forma continua y por ello necesitarán la presencia constante de ciertas enzimas, de manera que su producción es independiente de las variaciones del medio celular: son las *enzimas constitutivas*. Por el contrario, hay otras cuya presencia o ausencia está en relación con el medio: son las *enzimas adaptativas*. En este último caso, cuando la presencia del sustrato sobre el que va a actuar la enzima estimula su síntesis implica que se trata de un *sistema enzimático inducible*, mientras que si la presencia del propio producto final de la reacción que cataliza la enzima inhibe la síntesis de la misma, entonces se trata de un *sistema enzimático represible*.

El sistema inducible lactosa o, abreviadamente, *sistema lac* de *Escherichia coli* analizado por Jacob, Monod y colaboradores permitió establecer un modelo genético –el *operón* (Jacob and Monod, 1961a)- esencial para la comprensión de la regulación de la actividad génica. Como consecuencia de la evidencia experimental acumulada, Jacob y Monod (1961a y b) propusieron su modelo de operón constituido por el gen regulador y el represor citoplásmico que produce y por el operador y los genes estructurales que controla, definiendo el operón como una “unidad genética de expresión coordinada”; es decir, al conjunto del operador y los genes estructurales que controla (Jacob *et al.*, 1960). Ellos mismos reunieron la evidencia experimental que permitía aplicar su modelo del operón a sistemas enzimáticos represibles. Francois Jacob y Jacques Monod recibieron el Premio Nobel en 1965 “por sus descubrimientos en relación con el control genético de la síntesis de enzimas”, compartiéndolo con André Lwoff, director del laboratorio del Instituto Pasteur donde ellos trabajaron. Lwoff descubrió el fenómeno de la *lisogenia* (Lwoff et Gutmann, 1950; Lwoff *et al.*, 1950; Lwoff, 1953) por el que el ADN del fago se integra en el cromosoma de la bacteria y no produce la respuesta lítica al no haber multiplicación del ADN viral ni

maduración de viriones. Cuando las bacterias replican su ADN lo hace también el ADN viral que lleva integrado (profago), transmitiéndose así de generación en generación. A estas bacterias se les denomina *lisogénicas* en atención a que pueden perpetuar los fagos que llevan en un estado no infeccioso (condición de *profago*, Lwoff and Gutmann, 1950) y, con una cierta frecuencia, liberar fagos infectivos (*inducción*) cuando en el medio realmente no los había.

Además de su aportación al modelo genético de regulación, no se puede olvidar la influencia del pensamiento de Monod (1970) a través de su libro “Le hasard et la nécessité” y de Jacob (1970) con su obra “La logique du vivant” y de su autobiografía (“La statue interieure”, 1987).

1.2. Regulación post-transcripcional: Interferencia por ARN (ARNi)

En 2006, la Asamblea Nobel del Instituto Karolinska otorgaba el Premio Nobel de Fisiología o Medicina a Andrew Z. Fire y Craig C. Mello “por su descubrimiento de la interferencia por ARN: el silenciamiento de los genes por el ARN de cadena doble”.

Como señalaba Daneholt, Presidente de la Asamblea Nobel, en su comentario científico institucional (“RNA interference”) al galardón concedido a Fire y Mello, antes del descubrimiento de la *interferencia por ARN* se había descrito en plantas un fenómeno llamado silenciamiento génico mediatizado por ARN. En la década de los noventa se observó que al introducir un transgén en el genoma de un organismo transgénico su efecto podía consistir en la estimulación de la actividad génica o, por el contrario, en la inhibición de la expresión de secuencias homólogas, denominándose a este fenómeno como *silenciamiento génico dependiente de homología*. La inhibición de la actividad génica podía producirse a nivel de transcripción (*silenciamiento génico transcripcional*, TGS) o post-transcripcional (*silenciamiento génico post-transcripcional*, PTGS). Sin embargo, aunque era evidente que el ARN jugaba un papel fundamental en estos procesos, no se supo dar explicaciones convincentes del PTGS hasta que FIRE, Mello y colaboradores descubrieron el fenómeno de la *interferencia por ARN* (Fire *et al.*, 1998).

El trabajo fundamental de Fire y Mello consistió en inyectar moléculas aisladas de ARN con sentido (*sense RNA*) y de ARN antisentido (*antisense RNA*) en el nematodo *Caenorhabditis elegans*, comprobando que el efecto fenotípico por el silenciamiento de un gen específico (el gen *unc-22* que codifica para una proteína muscular) era escaso, si

alguno. En cambio, la inyección del gusano con ARN bicatenario (*bi-stranded RNA*, ARNs) formado por las hélices de ARN con sentido y ARN antisentido de dicho gen producía el efecto fenotípico esperado (*"twitcher"*) correspondiente a la falta de expresión del gen en cuestión. Aunque en su trabajo de 1998 Fire y Mello no pudieron determinar si el ARNs actuaba a nivel transcripcional o post-transcripcional, en un trabajo posterior de Fire publicado el mismo año (Montgomery *et al.*, 1998) se demostraba que el ARNs actuaba a nivel post-transcripcional de manera que el ARNm diana era degradado, impidiendo así el proceso de traducción y la síntesis de la proteína correspondiente. Además, los autores presentaban un modelo de cómo el ARNs podía actuar de una forma *catalítica* para degradar el ARNm homólogo. Es decir, el mecanismo de acción propuesto era diferente al "modelo del ARN antisentido" descrito previamente por otros autores. El nombre de *"interferencia mediatizada por el ARN (ARNi)"* con que se ha bautizado al nuevo mecanismo de silenciamiento de los genes había sido propuesto el año anterior por Mello (Rochelau *et al.*, 1997).

Las principales conclusiones del trabajo de Fire y Mello fueron las siguientes: 1) el efecto silenciador del ARNs no lo igualan ni el ARN monocatenario con sentido ni el ARN antisentido; 2) el silenciamiento es específico para un ARNm homólogo al ARNs, de forma que ningún otro ARNm se ve afectado por la presencia del ARNs; 3) para que se produzca el silenciamiento el ARNs tiene que mostrar homología con el ARNm maduro; es decir, no reconoce secuencias de intrones ni de promotores, de donde se deduce que el proceso de silenciamiento ocurre en el citoplasma; 4) el ARNm afectado por el silenciamiento es degradado, desapareciendo del citoplasma; 5) puesto que bastan unas pocas moléculas de ARNs para lograr el silenciamiento génico de la célula, se infiere que debe haber una amplificación del ARNs o bien que éste tenga una acción catalítica y no estequiométrica; 6) el efecto del ARNs podría extenderse de unos tejidos a otros o incluso a la descendencia.

El mecanismo molecular del proceso de interferencia por ARN (ARNi) fue descrito por otros investigadores utilizando un sistema *in vitro* de extractos embrionarios de *Drosophila* (Tuschi *et al.*, 1999), demostrando que el ARNs es procesado a fragmentos pequeños de 21 a 23 nucleótidos (Zamore *et al.*, 2000). Posteriormente, Fire y Mello analizaron el proceso *in vivo*, demostrando que el ARNs es fragmentado en trozos de unos 25 nucleótidos y que el ARN antisentido dispara el proceso de degradación del

ARNm por emparejamiento base a base al propio ARNm (Parrish *et al.*, 2000). El procesamiento del ARNs a fragmentos pequeños se produce por la acción de una ribonucleasa denominada *Dicer* (“picadora”) (Bernstein *et al.*, 2001), mientras que en la degradación del ARNm interviene un gran complejo ribonucleoproteico denominado *Risc* (por *RNA-induced silencing complex*) que contiene al menos una proteína de la familia *argonauta* que actúa como una endonucleasa cortando y degradando el ARNm (Hammond *et al.*, 2000). Revisiones de los mecanismos moleculares del proceso de silenciamiento por ARN (ARNi) han sido realizadas por Hannon (2002), Mello y Conter (2004), Meister y Tuschli ((2004) y Hammond (2005), además de las propias “Nobel Lectures 2006” de los galardonados Fire y Mello.

Como señala Daneholt (2006), el significado biológico y genético del descubrimiento del fenómeno de la interferencia por ARN (ARNi) se extiende a la protección contra infecciones virales, a la estabilidad de los genomas silenciando los elementos genéticos móviles, la regulación post-transcripcional de la expresión génica en los procesos de desarrollo, la regulación transcripcional de la expresión génica por el mantenimiento de la condensación de la cromatina que impide la expresión de sus genes, la utilización como herramienta experimental para silenciar genes específicos así como la posible utilización en la terapia génica.

2. Genética del desarrollo (ver Lacadena, 1988, 1999)

Desde el punto de vista genético, el *desarrollo* puede definirse como un “proceso regulado de crecimiento y diferenciación resultante de la interacción núcleo-citoplásmica, del ambiente celular interno del individuo y del medio externo, mediante el cual se produce la formación del individuo adulto a partir de una célula inicial única: el cigoto”. Al producirse la fecundación de los gametos se origina el cigoto que 51osib, ya desde el mismo instante de su formación, la información genética necesaria para programar la formación del nuevo ser, de manera que, de no mediar alteraciones de cualquier tipo que interfieran con el proceso, a partir del momento en que empieza a funcionar el primer gen en dicha célula la programación genética conducirá inexorablemente a la formación del individuo adulto. El proceso del desarrollo constituye, pues, una secuencia programada de cambios fenotípicos controlados espacial y temporalmente que constituyen el ciclo vital del organismo. En resumen, podría definirse a cualquier organismo o *individuo* como *aquello que exige su ADN que sea*. Aunque a primera vista esta definición genética de individuo

puede parecer excesivamente determinista, en realidad no lo es si se tiene en cuenta la definición de desarrollo antes indicada puesto que el desenvolvimiento o realización progresiva del programa genético contenido en el cigoto va a estar mediatizado en mayor o menor medida por factores ambientales, según sean los organismos, los caracteres y el tiempo de acción de que se trate.

La *Genética del Desarrollo*, como disciplina, estudia los procesos genéticos que controlan el paso de cigoto a adulto. Las concepciones clásicas de preformación (Hartsoecker, 1695) y de epigénesis (Wolff, 1759) tienen un paralelismo genético conceptual por cuanto, por un lado, el cigoto tiene esencialmente ya en forma de ADN lo que ha de ser el nuevo individuo (preformación) y, por otro lado, esa información genética controla temporal y espacialmente los procesos que constituyen las sucesivas etapas del desarrollo como actualización de las potencialidades contenidas en el cigoto (epigénesis).

Dentro del proceso total cabe distinguir los siguientes fenómenos o *componentes del desarrollo*:

- El *crecimiento*, que produce el aumento en masa del organismo;
- la *diferenciación celular* o *citodiferenciación*, fenómeno por el cual células que tienen un origen común y, por lo tanto, son genéticamente idénticas, divergen en su estructura y/o función, dando lugar a líneas celulares morfológica y/o fisiológicamente diferentes;
- la *histogénesis*, como resultado de la agregación de células diferenciadas para constituir un tejido con función especializada;
- la *organogénesis*, como consecuencia de la asociación de tejidos, dando lugar a
- la *morfogénesis*, como proceso mediante el cual se van desarrollando en el embrión los diferentes órganos del adulto a partir de estructuras indiferenciadas;
- por último, podría considerarse el *comportamiento*, como una expresión multidimensional del desarrollo.

a) *Morfogénesis*

En el presente contexto, vamos a hacer referencia expresa, en primer lugar, a la morfogénesis, que puede definirse también como el conjunto de procesos a través de los

cuales los embriones o partes de ellos cambian de forma y los grupos de células cambian de posiciones relativas en el espacio (*movimientos morfogénicos*). La morfogénesis da lugar a la forma final del individuo adulto estableciendo un patrón específico de tejidos y órganos que implica relaciones definidas de unos con otros en términos de tamaño y contenido celulares. Por consiguiente, los procesos morfogénicos, en su sentido más amplio, constituyen un nexo entre la acción génica primaria y la morfología.

Entre los organismos eucarióticos, *Drosophila melanogaster* constituye uno de los materiales biológicos más apropiados para el estudio de la morfogénesis porque, junto al profundo conocimiento de su biología y genética, presenta la propiedad de poseer *autonomía celular* al secretar individualmente cada célula las estructuras cuticulares específicas y la posibilidad de formar cepas celulares con constituciones citogenéticas óptimas para este tipo de estudios en cuestión.

Como ocurre en cualquier estudio genético, para hacer un análisis del desarrollo es necesario disponer de métodos selectivos de inducción y aislamiento de mutantes. Se llaman *mutantes morfogénicos* a aquellos cuyo efecto reside en interferir la organización y desarrollo de diversos grupos celulares más que alterar la síntesis de productos necesarios para el metabolismo y función de las propias células (García-Bellido, 1972).

En *Drosophila melanogaster*, que tiene un patrón de desarrollo segmentado, hay mutaciones que afectan a los genes que controlan la organización espacial del individuo: *genes de efecto materno* que controlan la polaridad del embrión, *genes de segmentación* que controlan el número y la polaridad de los segmentos, y *genes homeóticos* que especifican la identidad de los segmentos. Estos tipos de genes que controlan el desarrollo temprano del embrión de *Drosophila* son los que han estudiado Edward B. Lewis, Christiane Nüsslein-Volhard y Eric F. Wieschaus y por cuyos trabajos recibieron el premio Nobel en 1995.

Como indican Nüsslein-Volhard y Wieschaus (1980), el proceso de segmentación de *Drosophila* incluye tres niveles de organización espacial: el huevo completo como una unidad de desarrollo, una unidad que se repite con una longitud de dos segmentos y el segmento individual.

Los genes de efecto materno –es decir, influencia del genotipo materno vía citoplasma a través del ARN mensajero- son responsables de que un embrión simétrico

sepa reconocer la polaridad anterior-posterior y la dorsal-ventral (Anderson and Nüsslein-Volhard, 1984; Anderson *et al.*, 1985a y b).

Tras la expresión de los genes que determinan la polaridad del embrión entran en acción los que afectan al patrón de segmentación (cabeza, tres segmentos torácicos y ocho segmentos abdominales), controlando el número y polaridad de los segmentos. Nüsslein-Volhard y Wieschaus (1980) identificaron mutaciones en 15 loci implicados en tales procesos que agruparon en tres clases: los que producen un patrón de duplicación (anterior-posterior) en cada segmento (mutantes de polaridad del segmento; 6 loci), los que originan un patrón de delección en segmentos alternantes (mutantes de “regla de pares”; 6 loci) y los que dan lugar a un patrón de pérdida de un grupo de segmentos adyacentes (mutantes de ausencia; 3 loci). En condiciones normales, actúan primero los genes que regulan el número, seguidos de los genes de la “regla de pares” y, por último, los genes de polaridad. Y, como decíamos antes, todos ellos después de los genes de polaridad general del embrión.

La identidad de los segmentos (varios de la cabeza, protórax, mesotórax, metatórax, y abdominales A1-A8) está determinada por los genes homeóticos. El término *homeosis* – que ha cumplido un siglo (Lewis, 1994)- fue utilizado por William Bateson (1894) para explicar un tipo de variación en el que “alguna cosa cambia, pareciéndose a otra cosa distinta” y atribuir a las variaciones homeóticas la explicación de los cambios drásticos en la evolución.

El primer mutante homeótico que se describió (Bridges) fue el denominado *bithorax* de *Drosophila* que produce la transformación del segmento metatorácico en mesotorácico y, por consiguiente, la del halterio o balancín en ala; en consecuencia, la mosca adulta *bithorax* tiene dos pares de alas en lugar de un solo par. Muchos años más tarde, Lewis (1951, 1964, 1967) inició sus estudios que le llevaron a conocer que el “locus” *bithorax* es realmente un complejo génico (*complejo bithorax*, BX-C) y que los patrones de segmentación son consistentes con un gradiente antero-posterior de concentración de cierta substancia represora a lo largo del embrión y de un gradiente próximo-distal a lo largo del cromosoma respecto a las afinidades hacia el represor del elemento regulador en *cis* de cada uno de los genes del complejo *bithorax* (Lewis, 1978). Al analizar posteriormente la estructura molecular de BX-C se ha encontrado que hay un sorprendente paralelismo entre la organización de los genes del complejo *bithorax* en el ADN y los segmentos para los

que codifican. Esta manifestación del binomio estructura (organización genética) – función (segmentación) es lo que Lewis (1985) ha llamado “regla de la colinealidad” (ver Duboule and Morata, 1994). Es digno de mencionar aquí también el caso similar del fago T7 de *Escherichia coli* en el que los genes tempranos, medios y tardíos están situados en el cromosoma lineal del virus en el mismo orden en el que actúan durante el proceso de infección (iniciación, replicación del ADN viral, morfogénesis) (Studier, 1972). Ambos casos resultan de interés dentro de una posible controversia orden *versus* caos en la organización genética a los niveles molecular y cromosómico (organización supracromosómica. Ver Lacadena, 1996).

Lo mismo que el complejo *bithorax* controla el desarrollo de los segmentos T2 posterior-T3-A1 a A8, el desarrollo de los segmentos de la cabeza y los torácicos T1 y T2 anterior está controlado por el complejo *antennapedia* (ANT-C). Es decir, los genes de los complejos ANT-C y BX-C controlan el desarrollo de todo el cuerpo de la mosca a excepción de las porciones más distales. Al conjunto de los dos complejos se le denomina *complejo homeótico*, HOM-C.

Cuando a Lewis, Nüsslein-Volhard y Wieschaus les concedieron en 1995 el premio Nobel por “sus descubrimientos del control genético del desarrollo temprano del embrión”, el propio Instituto Karolinska señalaba la importancia de los descubrimientos realizados en *Drosophila* porque podían ser aplicados a animales superiores e incluso al desarrollo humano. Efectivamente, en los vertebrados la información genética equivalente a los complejos ANT-C y BX-C forman un único complejo estrechamente ligado denominado *complejo homeótico Hox* (ver Krumlauf, 1994). En el caso del ratón y del hombre el complejo *Hox* está repetido cuatro veces (Hox-A, Hox-B, Hox-C y Hox-D) y localizado en cuatro cromosomas diferentes. A pesar del inconveniente que supone esta redundancia de información genética para realizar el análisis genético adecuado, sin embargo está siendo muy importante el progreso en relación al conocimiento de cómo el complejo homeótico Hox controla la especificación del plan de desarrollo del cuerpo en los vertebrados.

Mencionaba antes las palabras de Dobzhansky en las que decía que “*Drosophila* ya no es la reina de la Genética, sino que ha pasado a la honorífica oscuridad de una reina fundadora”. La concesión del premio Nobel de Fisiología y Medicina de 1995 volvió a poner a *Drosophila* en un lugar de honor.

b) Muerte celular programada o apoptosis

Siete años más tarde, la institución Nobel volvió a otorgar su galardón a investigaciones relacionadas con el desarrollo. Así, el año 2002, la Asamblea Nobel del Instituto Karolinska decidió otorgar el Premio Nobel en Fisiología o Medicina conjuntamente a los doctores Sydney Brenner, H. Robert Horvitz y John E. Sulston por sus descubrimientos sobre “la regulación genética del desarrollo de los órganos y la muerte celular programada”. No debe resultar, pues, extraño que utilizara como título de mi intervención en la sesión científica conmemorativa de la Real Academia Nacional de Farmacia el mismo de la novela del también premio Nobel 1982 de Literatura Gabriel García Márquez –“Crónica de una muerte anunciada”– como sinónimo de la muerte celular programada. Lo que sigue a continuación está tomado de dicha intervención (Lacadena, 2003 a):

Apoptosis es un neologismo derivado de la palabra griega (αποπτωσις) utilizada para significar la “caída de la hoja” –debido al significado de “ptosis” (πτωσις, “caída”) y el prefijo “apo” (απο, “inducción a”)– referida a la pérdida otoñal de las hojas. Como señala el Prof. Carlos Vicente Córdoba (comunicación personal), hoy día se admite que hay muchos procesos fisiológicos que antes se relacionaban con percepción de señales externas de tipo estacional (temperatura, luz, etc.) pero que se han revelado como sistemas genéticos programados. La caída de las hojas, la dehiscencia de los frutos, la muerte del citoplasma de los elementos xilemáticos para formar los vasos, la formación de las glándulas de acumulación de aceites en el pericarpio de los cítricos, la pérdida de la capa de aleurona en los granos de los cereales, son otros tantos ejemplos de una muerte celular programada en el desarrollo de las plantas. Hay descritos más de 50 genes programados que conciernen sobre todo a enzimas tipo glucanasas, poligalacturonasas, metalotioneínas, inhibidores de proteinasas, etc. Tales genes entran en funcionamiento incluso en ausencia de los factores ambientales que tiempo atrás se creía que determinaban los hechos fisiológicos antes enumerados. Incluso podría recordarse aquí que la primera observación microscópica de las celdillas del corcho realizada por Hooke en 1665 correspondían a células muertas por un proceso apoptótico.

La Genética y la Bioquímica se han apropiado del significado griego original del término “apoptosis”, de manera que en la actualidad se identifica con el fenómeno genético de muerte celular programada y los procesos que de ella se derivan en la regulación del desarrollo. Así, nos encontramos con las siguientes definiciones:

- Diccionario de la Lengua Española de la RAE (22^a edición, 2001): Apoptosis: f. *Biol.* “Modalidad específica de muerte celular, implicada en el control del desarrollo y el crecimiento”. Asimismo, incluye también el término ptosis: Del gr. (πτωσις, caída). F. *Med.* “Caída o prolapso de un órgano o parte de él”.
- Vocabulario Científico y Técnico de la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales (3^a edición, 1996): Apoptosis: “Modalidad específica de muerte celular implicada en la regulación del desarrollo y crecimiento. El acontecimiento bioquímico más importante que la define es la fragmentación del DNA por la acción de una endonucleasa específica que corta la doble hélice en las regiones internucleosomales”

Como dice Hengartner (2000), a lo largo de dos siglos, la muerte celular programada fue descubierta y redescubierta en repetidas ocasiones por varios biólogos del desarrollo y citólogos, recibiendo distintas denominaciones (ver Vaux y Korsmeyer, 1999). De hecho, los biólogos del desarrollo se dieron cuenta de que la muerte celular estaba implicada en el proceso de metamorfosis, tanto de insectos como de mamíferos. Así, por ejemplo, la expresión “muerte celular programada” fue introducida en 1965 por Lockshin para describir la muerte celular que ocurría durante la metamorfosis de insectos (Lockshin y Williams, 1965). Sin embargo, fue finalmente en 1972 cuando se adoptó el nombre de “apoptosis” como término elegido por Currie y colaboradores en un artículo publicado en la revista *British of Journal Cancer* (Kerr *et al.*, 1972) para describir un tipo común de muerte celular programada que los autores observaban en diferentes tipos de células y tejidos.

Las alteraciones de la apoptosis pueden contribuir a los procesos cancerosos y a enfermedades autoinmunes y degenerativas. La apoptosis es un mecanismo de suicidio celular que permite a los metazoos controlar el número de células en sus tejidos y eliminar las células que ponen en peligro la supervivencia del organismo. Algunas células tienen en su superficie unos sensores especiales, denominados “receptores de muerte”, capaces de detectar la presencia de “señales de muerte” extracelulares y responder rápidamente poniendo en marcha la maquinaria apoptótica intrínseca de la célula (ver revisión por Ashkenazi y Dixit, 1998).

La apoptosis es una forma de suicidio celular evolutivamente conservada que requiere de una maquinaria especializada cuyo componente central es un sistema proteolítico que incluye a una familia de proteínas denominadas “caspasas” (por *cysteine aspartate proteases*) muy conservadas en la evolución. En la especie humana se han descrito más de una docena de caspasas. Estas enzimas participan en una cascada de acontecimientos como respuesta a señales pro-apoptóticas, culminando en la rotura de una serie de proteínas que da lugar a la desmembración de la célula. En la apoptosis, las caspasas funcionan tanto en la desorganización de la célula (efectoras) como iniciando dicho proceso como respuesta a señales pro-apoptóticas (iniciadoras). Los sucesos apoptóticos incluyen la fragmentación internucleosomal del ADN, la condensación de la cromatina, arrugamiento de la célula sin perder su membrana plasmática y, finalmente, su desmembramiento en vesículas envueltas por membranas que forman los llamados “cuerpos apoptóticos”, etc. (revisiones por Thornberry y Lazebnik, 1998; Hengartner, 2000). El proceso de apoptosis incluye varias fases distintas como son las de decisión, ejecución, fagocitación y degradación. Es importante mencionar que no siempre la apoptosis es consecuencia de una muerte celular programada, sino que puede inducirse como resultado de ciertos tratamientos experimentales. Además, por otro lado, a veces puede ocurrir la muerte celular programada sin que tengan lugar los procesos apoptóticos generales antes mencionados.

Un segundo conjunto de proteínas –la familia *Bcl-2*– juega un papel regulador importante en los procesos apoptóticos. De acuerdo con sus semejanzas estructurales y criterios funcionales, las proteínas de esta familia están divididas en tres grupos: los miembros del grupo I tienen actividad anti-apoptótica, mientras que las de los grupos II y III promueven la muerte celular. El gen anti-apoptótico *Bcl-2* de mamíferos tiene su homólogo en el gen *Ced-9* del nematodo *C. elegans* que inactiva la acción apoptótica del gen *Ced-4*, a los que más adelante nos referiremos (ver revisiones por Adams y Cory, 1998; Hengartner, 2000).

El papel de las mitocondrias en la apoptosis es importante. Hay varios acontecimientos clave de la apoptosis que implican a las mitocondrias como, por ejemplo, la liberación de activadores de las caspasas (como el citocromo c), los cambios en el transporte de electrones, la pérdida de potencial transmembrana de las mitocondrias, la alteración de la oxidación-reducción y la participación de proteínas pro- y anti-

apoptóticas de la familia *Bcl-2*. Las señales que actúan sobre las mitocondrias activando o inhibiendo tales sucesos y sus efectos en cascada permiten delinear varios patrones de muerte celular fisiológica (ver revisiones por Green y Reed, 1998; Hengartner, 2000).

En muchas ocasiones, las publicaciones científicas actuales sobre la apoptosis ignoran o silencian el origen genético de su concepto (ver, por citar un ejemplo, Marsden *et al.*, 2002). Posiblemente, a muchos investigadores que trabajan en el campo de la apoptosis ni siquiera les sonara los nombres de Sydney Brenner o de John E. Sulston al saltar a los medios de comunicación el día 7 de Octubre de 2002 cuando la Asamblea Nobel del Instituto Karolinska emitió su comunicado de prensa anunciando la concesión del premio Nobel 2002 en Fisiología o Medicina. Sin embargo, según he podido constatar en algunas revisiones importantes, a H. Robert Horvitz se le menciona más en tales trabajos.

En un lugar anterior se hacía referencia al papel de *Drosophila* como especie modelo en Genética y cómo los premios Nobel concedidos en 1995 a Lewis, Nüsslein-Volhard y Wieshaus por sus investigaciones sobre los genes que controlan el desarrollo temprano del embrión de *Drosophila* le habían rescatado de la honorífica oscuridad de una “reina fundadora”. Pues bien, el Premio Nobel 2002 hizo justicia al papel que otro organismo, el nematodo *Caenorhabditis elegans*, ha jugado en la investigación sobre los mecanismos genéticos que regulan el proceso de desarrollo y la muerte celular programada.

La utilización del nematodo *Caenorhabditis elegans* como modelo experimental se debe a Sydney Brenner, uno de los galardonados en 2002. La figura científica de Sydney Brenner es extraordinaria, no solamente por la que ha sido la razón de haberle otorgado el premio Nobel en 2002, sino porque hacía ya 40 años que había hecho méritos para ello como componente del grupo de científicos considerados como los fundadores de la Genética Molecular (ver Stent 1971; Stent y Calendar, 1978). Parece ser que él mismo decía con cierta amargura que era el único de ellos al que no se le había otorgado el premio Nobel; de hecho, Brenner había colaborado con el premio Nobel Francis H. Crick en la demostración de que el código genético se lee en grupos de tres letras: los codones, según el término propuesto por el propio Brenner (Crick *et al.*, 1961). Asimismo, entre otras cosas, participó en la demostración experimental en 1961 de la existencia del ARN mensajero en colaboración con el premio Nobel François Jacob y Matthew Meselson

(Brenner et al., 1961) y en la demostración experimental (“principio de colinealidad”) en 1964 –utilizando las mutaciones ambar de los codones sin sentido en colaboración con Sarabhai (Sarabhai et al., 1964)– de la “hipótesis de la secuencia” propuesta por Crick en 1958, que establecía la correspondencia entre la ordenación secuencial de las bases en el ADN y la secuencia de aminoácidos en las proteínas, que fue una de las ideas más fecundas de la historia de la Genética.

Como se ha mencionado anteriormente, la regla de oro de la investigación biológica, extensible obviamente a la investigación genética, se basa en los tres puntos siguientes: qué pregunta o problema se trata de resolver, en qué material biológico y mediante qué técnica y metodología. Como se verá más adelante, en la historia de los premios Nobel en relación con la Genética ha habido algunos galardonados que introdujeron nuevos organismos en la investigación, como son los casos de la mosca del vinagre (*Drosophila melanogaster*) introducida por Morgan, el moho del pan (*Neurospora crassa*) por Beadle y Tatum, los virus bacteriófagos (T-2, T-4) por Delbrück y Luria, las bacterias (*Escherichia coli*) por Lederberg o la levadura (*Schizosaccharomyces pombe*) por Nurse, por citar algunos ejemplos bien conocidos.

Sydney Brenner tuvo la clarividencia de introducir en la investigación genética como nuevo organismo al nematodo *Caenorhabditis elegans* que, en palabras de la institución Nobel, es un organismo modelo experimental novedoso que proporciona una oportunidad única de unir el análisis genético a la división celular, la diferenciación y la organogénesis y que permitía seguir estos procesos bajo la observación del microscopio. Este gusano, de 1 mm de longitud, se cultiva en placas Petri sobre un medio de agar como las bacterias, tiene un corto tiempo de generación (63 horas “de huevo a huevo”, a 20°C, según Sternberg y Horvitz, 1984) y, al ser transparente su cutícula, permite seguir los procesos de división celular bajo el microscopio con sistema de contraste de interferencia diferencial de Nomarski (en palabras de un comentarista, es como un “tubo de ensayo viviente”); además, se puede conservar en congelación por tiempo ilimitado. Biológicamente, este nematodo es hermafrodita con capacidad de autorreproducción, aunque también existen individuos masculinos. Su constitución cromosómica es $2n = 12$, XX para los hermafroditas y $2n = 11$, X0 para los machos. Por su interés en la investigación genética, el genoma de *C. elegans*, de 97.000.000 pb, fue secuenciado en 1998 (The *C. elegans* Sequencing Consortium, 1998) con la decisiva intervención de Sulston –que

compartió el premio Nobel con Brenner- como Director del Sanger Centre de Cambridge. Su genoma contiene unos 19.000 genes, un número relativamente bajo tratándose de un organismo multicelular.

El paso decisivo en la comprensión de la muerte celular programada se debió a las investigaciones fundamentales realizadas por Brenner, Sulston y Horvitz con el nematodo *C. elegans* al descubrir que dicho proceso está regulado por unos genes concretos. En efecto, el organismo está formado por un número exacto de 1090 células somáticas de las que 131 morirán inexorablemente durante el proceso de desarrollo, de manera que esta muerte celular está controlada por un conjunto específico de genes. El individuo adulto está formado, pues, por 959 células.

Las bases genéticas del estudio del desarrollo del nematodo fueron establecidas por Brenner en 1974, demostrando que al inducir mutaciones con el mutágeno etil metanosulfonato (EMS) se podía establecer la relación biunívoca entre mutaciones génicas específicas con efectos concretos sobre el proceso de organogénesis. El trabajo de Brenner consistió en el aislamiento, análisis de complementación y mapeo de unas 300 mutaciones que afectaban a caracteres morfológicos y de comportamiento; unas 77 de estas últimas mutaciones alteraban el movimiento del gusano.

Según decía el propio Brenner en su trabajo pionero de 1974, él estaba interesado en el análisis genético del sistema nervioso, tratando de abordarlo con una metodología genética similar a la que se había utilizado con éxito en el análisis de las rutas biosintéticas de las bacterias o en los procesos de ensamblaje de los componentes proteicos de las cápsides de las partículas virales. De hecho, en *Drosophila* ya Benzer había iniciado investigaciones con mutantes de comportamiento. Esta especie tenía la ventaja del profundo conocimiento genético que de ella se tenía, por un lado, y la posibilidad de utilizar el elegante método genético de análisis de mosaicos que permitirían descubrir las sedes anatómicas de las anomalías genéticas del sistema nervioso, por otro lado. Con estos antecedentes –decía Brenner– “hace unos ocho años, cuando me embarqué en estos problemas, decidí que lo que necesitaba era un organismo experimental que fuera susceptible para el estudio genético y en el que se pudiera determinar la estructura completa del sistema nervioso. *Drosophila*, con unas 10^5 neuronas, era demasiado grande y, buscando un organismo más sencillo, mi elección finalmente se decidió por el pequeño nematodo, *Caenorhabditis elegans*”. A partir de aquí concentró su trabajo en dos líneas de

investigación: el desarrollo de métodos que permitieran determinar la estructura del sistema nervioso del gusano y establecer las características genética básicas de dicho organismo. En el primer estudio genético construyó el mapa genético mapeando unas cien mutaciones en los seis grupos de ligamiento de *C. elegans* (5 autosomas y el cromosoma sexual X). En 1974 publicó también otro trabajo, esta vez en colaboración con Sulston, también galardonado con este premio Nobel, en el que analizaban el ADN del gusano (Sulston y Brenner, 1974).

John E. Sulston, británico nacido en 1942, fue uno de los primeros colaboradores de Brenner para llevar adelante los estudios que éste había iniciado en *C. elegans*. Así, en el mismo año de 1974 publicaban juntos un artículo sobre la caracterización del ADN del nematodo, concluyendo que su genoma tenía un total de 8×10^7 pb (20 veces el tamaño del de la bacteria *E. coli*), con un 83% de secuencias únicas y un contenido medio del 36% de (G+C) y cuantificando el número de secuencias correspondientes a genes que codifican para ARNt y ARNr mediante hibridación ADN-ARN (Sulston y Brenner, 1974). Muchos años más tarde, Sulston participaba como Director del Sanger Centre de Cambridge en el Consorcio Internacional que llevó a cabo en 1998 la secuenciación completa del genoma de *C. elegans* (97.000.000 pb), tal como se ha mencionado anteriormente.

Volviendo a la historia genética de *C. elegans*, la aportación fundamental de John E. Sulston consistió en desarrollar las técnicas que permitían seguir al microscopio todas las divisiones celulares que ocurrían desde el mismo cigoto hasta las 959 células somáticas que componen el organismo adulto. Sulston describió el linaje celular durante el desarrollo de parte del sistema nervioso del gusano, que supone un tercio del total de células somáticas del organismo, demostrando que es invariante; es decir, durante el desarrollo, todos los individuos de *C. elegans* siguen el mismo programa de divisiones celulares y diferenciación (Sulston y Horvitz, 1977; Sulston *et al.*, 1983).

De acuerdo con los trabajos de Sulston y de Horvitz, el desarrollo del nematodo puede resumirse de la siguiente manera (tomado de Gilbert, 2000; ver también Wolpert *et al.*, 2002): El cigoto de *C. elegans* experimenta una *división holoblástica rotacional*. Durante la división embrionaria temprana, cada división asimétrica produce una *célula fundadora* (denominadas AB, MS, E, C y D), que produce células descendientes diferenciadas, y una *célula troncal* (linajes celulares P1 a P4). En la primera división celular, el surco de división está desplazado asimétricamente hacia el polo posterior

según el eje anterior-posterior, dando lugar a las células AB y P1. En la segunda división embrionaria, la célula AB se divide en dirección perpendicular al eje anterior-posterior, mientras que la célula P1 se divide transversalmente, dando lugar a otra célula fundadora (EMS) y a una célula troncal posterior P2. El linaje celular troncal siempre se divide transversalmente para dar lugar a una célula fundadora anterior y una troncal posterior que continúa el linaje celular.

Las células descendientes de cada célula fundadora se dividen en momentos específicos que son iguales en cualquier individuo en desarrollo hasta alcanzar el número exacto de 558 células en las larvas recién eclosionadas.

La determinación del eje anterior-posterior viene definida por la posición del pronúcleo espermático en el citoplasma del ovocito al producirse la fecundación. Otra nueva asimetría en el eje anterior-posterior es la debida a la migración hacia el polo posterior del cigoto de los gránulos polares (gránulos P) de compleja naturaleza ribonucleoproteica, que serán responsables de la diferenciación de las células germinales. En consecuencia, en la primera división los gránulos P quedan exclusivamente en la célula P1, los cuales, a su vez, pasarán a la célula P2 cuando se divida la célula P1. Sin embargo, durante la división de P2 y P3 los gránulos P se asocian con el núcleo que entra en el citoplasma P3. Finalmente, los gránulos P pasarán a la célula P4 cuya progenie celular dará lugar a los espermatozoides y óvulos del individuo adulto.

Por otro lado, la definición del eje dorsal-ventral se produce en la división de la célula fundadora AB que, al resultar más larga que ancha, lo cual produce un deslizamiento de las células hijas, dando lugar a una célula hija anterior (Aba) y otra posterior (Abp). Este deslizamiento hace que la célula Abp se coloque por encima de la célula fundadora EMS que resulta de la división de P1. La célula Abp define el futuro lado dorsal del embrión mientras que la célula EMS, precursora del músculo y del intestino, marcará la superficie ventral del embrión. Finalmente, el eje lateral derecha-izquierda se especificará en el estadio de 12 células cuando el blastómero MS (producido por la división de la célula fundadora EMS) entre en contacto con las "células nietas" de la célula Aba, distinguiendo el lado derecho y el izquierdo del cuerpo.

Como consecuencia de sus primeros estudios, Sulston llegó a demostrar que en el linaje celular se produce la muerte programada de determinadas células y que este suceso podía ser visualizado en el organismo vivo. Además, Sulston describió las etapas visibles

de la muerte celular e identificó las primeras mutaciones de genes implicados en el proceso de muerte celular programada. Uno de estos genes, el *nuc-1*, codifica para una proteína necesaria para la degradación del ADN, que es una de las características del proceso.

La tercera fase de la historia genética del nematodo la llevó a cabo H. Robert Horvitz, norteamericano nacido en 1947, cuya aportación fundamental fue investigar si realmente existía un programa genético que controlara la muerte celular, identificando en 1986 los dos primeros “genes de la muerte” (*ced-3* y *ced-4*) cuya expresión es necesaria para que se produzca la muerte de la célula (Ellis y Horvitz, 1986). Posteriormente, Horvitz identificó otros genes, como el *ced-9*, que protegen a las células de la muerte interaccionando con *ced-3* y *ced-4*. Asimismo, identificó otros genes responsables de la eliminación de las células cuya muerte había sido genéticamente programada.

La proteína CED-4 es un factor activador de la proteasa CED-3 que inicia la destrucción de la célula. Las mutaciones que inactivan la proteína CED-9 originan la muerte de muchas células que deberían sobrevivir, pero que mueren al ser activados los genes *ced-3* y *ced-4*. Por el contrario, mutaciones de ganancia de función del gen *ced-9* permiten la síntesis de la proteína CED-9 de manera que sobreviven las células que estaban programadas para morir.

Las proteínas CED-3 y CED-4 constituyen el núcleo central de la ruta genética de la apoptosis que es común a todas las especies animales estudiadas. En mamíferos, las proteínas homólogas a la CED-9 son codificadas por genes de la familia *Bcl-2*, cuya semejanza funcional es tal que, por ejemplo, el gen humano *BCL-2* introducido en embriones de *C. elegans* impide la muerte programada de determinadas células durante el desarrollo embrionario del nematodo (Vaux *et al.*, 1992). Este hecho pone de manifiesto que el proceso de apoptosis está evolutivamente conservado. De ahí la importancia que pueden tener las investigaciones llevadas a cabo en organismos como el nematodo para ser extrapoladas y aplicadas en la especie humana.

En este contexto es importante señalar que, como indican Vaux y Korsmeyer (1999), aunque el primer componente reconocido de un mecanismo de muerte celular fue el gen *Bcl-2* de mamíferos, la primera evidencia de que existía un programa genético específico para la muerte celular fisiológica se debió a los trabajos de Horvitz (Horvitz *et al.*, 1982; Ellis y Horvitz, 1986).

La proteína homóloga a la CED-4 en mamíferos es la Apaf-1 (por *apoptotic protease activating factor-1*) que participa en la activación dependiente de citocromo-c de las proteínas homólogas de la CED-3, la caspasa-9 y la caspasa-3.

Así como los nematodos deficientes para CED-4 son viables a pesar de tener un 15% más de células que los individuos normales, los ratones con mutaciones de pérdida de función en los genes que codifican para la caspasa-3 o la caspasa-9 sufren la muerte perinatal por crecimiento masivo celular del sistema nervioso. Por otro lado, ratones homocigotos para la delección del gen *Apf-1* presentan anomalías craneofaciales y sobrecrecimiento del cerebro, así como membranas interdigitales.

En los mamíferos existen varios patrones apoptóticos. Por ejemplo, la apoptosis de los linfocitos no es afectada por la delección de los genes *Apf-1* o caspasa-9 y la cascada de acontecimientos genéticos apoptóticos se inicia por la proteína CD95 en la membrana plasmática del linfocito.

Como señala Gilbert (2000), las 131 células que mueren como parte normal del desarrollo del nematodo podrían compararse con las 10^{11} células humanas que mueren diariamente en un individuo adulto y que son sustituidas por otras células, pudiéndose estimar que la masa celular perdida cada año por muerte programada es equiparable al peso del individuo. Además, durante el desarrollo intrauterino se están generando y destruyendo células de forma continuada; incluso, se producen el triple número de neuronas de las que constituirán nuestro cerebro al nacer. La apoptosis es necesaria, no solamente para el adecuado espaciamiento y orientación de las neuronas sino, por ejemplo, para generar el espacio auditivo medio, la apertura vaginal o el espacio interdigital.

Como decía un comentarista de la revista *Nature*, algunos científicos vieron en los premios Nobel de 2002 un significado de más largo alcance si los relacionamos con los premios Nobel en Fisiología o Medicina concedidos en 1995 y en 2001. Los primeros fueron los concedidos a Lewis, Nüsslein-Volhard y Wieschaus “por sus descubrimientos sobre el control genético del desarrollo temprano del embrión” en investigaciones realizadas en mutantes morfogenéticos de la mosca del vinagre (*Drosophila melanogaster*) y los segundos a Hartwell, Hunt y Nurse “por sus descubrimientos de los reguladores clave del ciclo celular” en investigaciones realizadas con levaduras (*Schyzosaccharomyces pombe*). En palabras de Gerald Rubin, “estos premios son el reconocimiento de que se

pueden hacer importantes avances en la Medicina estudiando genéticamente organismos modelo dúctiles” como los insectos, las levaduras o los gusanos. Aquí debe señalarse que unos años más tarde, en 2006, se otorgó el premio Nobel a Fire y Mello por su trabajo fundamental sobre la regulación de la expresión génica mediante interferencia del ARN realizado también en *C. elegans* y a R.D. Kornberg por el análisis molecular del mecanismo de transcripción utilizando como modelo un sistema de transcripción *in vitro* con la ARN pol II de la levadura, *S. cerevisiae*.

c) Envejecimiento celular y telomerasa

Como se decía en un epígrafe anterior, dado que la ausencia en las células de la enzima telomerasa podría repercutir en la viabilidad de las mismas, Szostak y Greider relacionaron la falta de actividad telomerasa con procesos de envejecimiento y muerte celulares (Lunblad y Szostack, 1989; Greider, 1990) así como la actividad extemporánea con la inmortalidad de las células en los procesos cancerosos (Greider, 1993).

Por ello, además del interés que tiene desde el punto de vista de la investigación citogenética básica el premio Nobel de este año, no hay que olvidar su aplicación clínica en temas de cáncer y envejecimiento. La Dra. María A. Blasco trabajó bajo la dirección de la laureada Nobel 2009 Carol W. Greider investigando sobre los telómeros y la telomerasa y el papel que juegan en el envejecimiento y el cáncer. Durante su estancia en Cold Spring Harbor Laboratory (1993-1997), trabajando con Carol W. Greider, la Dra. Blasco clonó uno de los genes de la telomerasa en mamíferos y generó el primer ratón *knockout* para la telomerasa, demostrando que la actividad telomerasa es necesaria para prevenir el envejecimiento del organismo (Blasco *et al.*, 1997). Asimismo, la Dra. Blasco ha investigado el papel de la telomerasa en la obtención de células troncales pluripotentes inducidas (iPS) (Marion *et al.*, 2009).

d) Reprogramación celular: clonación por transferencia nuclear y células troncales pluripotentes inducidas (iPS)

El 8 de octubre de 2012 se hacía público que la Asamblea Nobel del Instituto Karolinska había concedido el Premio Nobel en Fisiología o Medicina 2012 a los Dres. Sir John B. Gurdon y Shinya Yamanaka “por el descubrimiento de que células maduras [diferenciadas] pueden ser reprogramadas para convertirse en pluripotentes”.

En la concesión de un premio Nobel puede premiarse una investigación pionera en un campo científico o una investigación posterior basada en el cambio de paradigma que supuso aquella. En el caso que hoy nos ocupa, la Asamblea Nobel ha tenido el acierto de premiar ambas cosas: por un lado, a Sir John B. Gurdon que hace 50 años, en 1962, demostró la posibilidad de que la información genética contenida en el núcleo de células diferenciadas de un anfibio pudiera ser reprogramada para reiniciar un proceso de desarrollo completo y, por otro lado, a Shinya Yamanaka que 44 años más tarde encontró las claves genéticas para inducir la reprogramación celular en mamíferos como el ratón y el ser humano

En el contexto del presente Premio Nobel, de los diferentes componentes del desarrollo antes mencionados solamente haremos referencia a la diferenciación celular. La citodiferenciación es debida a una *actividad génica diferencial* determinada por causas ambientales intra o extra celulares, aunque en algunas ocasiones pueda ser producida por o ir acompañada de *modificaciones cromosómicas estables* (numéricas, estructurales o fisiológicas) de la dotación cromosómica de las células. La cuestión fundamental que se plantea es si las células diferenciadas conservan la capacidad (*multipotencia* o *pluripotencia*) de originar un tejido u órgano diferente al que estaban programadas o a un organismo completo (*totipotencia*), comportándose como un verdadero cigoto si las condiciones experimentales las indujeran a ello.

Desde el punto de vista genético, por *reprogramación nuclear* se entiende el cambio en la expresión génica de una clase de célula a otro tipo de célula no relacionada con ella. Como señalaban Gurdon y Melton (2008), las primeras evidencias experimentales sobre reprogramación se obtuvieron en las décadas de los 50 y 60 del siglo pasado con los trabajos sobre clonación en anfibios. A partir de ahí habría que tener en cuenta las técnicas de clonación por *transferencia nuclear de células somáticas en mamíferos* (SCNT, somatic cell nuclear transfer), la *fusión celular*, las *células troncales* embrionarias y adultas, la *inducción de pluripotencia* por expresión génica ectópica (células iPS, induced pluripotent stem cells) y la *reprogramación directa* que permite transformar un tipo de célula diferenciada en otra célula diferenciada (transdiferenciación) sin pasar por la fase intermedia equivalente de una célula pluripotente. Lo mismo que en la Edad Media los alquimistas trataban de transmutar en oro a otros metales, en la actualidad estamos

viviendo una nueva clase de alquimia –la *alquimia celular* Ford, 2008)- que convierte una célula en otro tipo de célula.

El Premio Nobel en Fisiología o Medicina 2012 tiene que ver con la clonación por transferencia de núcleos (Gurdon) y con la inducción de células troncales pluripotentes (Yamanaka).

1.1. La clonación por transferencia de núcleos

a) Anfibios

En la década de los cincuenta del siglo pasado, Briggs, King y colaboradores (Briggs y King, 1952, 1953, 1960; King y Briggs, 1955; di Berardino y King, 1967) trasplantaron núcleos de células de blástula, gástrula, néurula y renacuajo de *Rana pipiens* a citoplasmas de óvulos sin fecundar que habían sido enucleados mediante micromanipulaciones para comprobar si tales núcleos eran capaces de dar marcha atrás en su proceso informativo y volver a dar un desarrollo normal. Los resultados obtenidos mostraron que al trasplantar núcleos del estadio de blástula se obtenía un desarrollo normal, mientras que al trasplantar los núcleos de células de gástrula, néurula o renacuajo disminuía de forma progresiva la capacidad de desarrollo. La conclusión evidente era que cuanto más diferenciadas estaban las células donantes de los núcleos tenían menos capacidad de desarrollo total (totipotencia).

Sin embargo, diez años después del primer experimento de Briggs y King, John B. Gurdon (1962) hizo un experimento que le ha valido el Premio Nobel sesenta años más tarde porque su investigación cambió la idea de que la diferenciación celular era un proceso irreversible, sentando las bases para el desarrollo posterior de las técnicas de reprogramación nuclear, tanto en la obtención de mamíferos clónicos como en la obtención de células troncales, de especial importancia en la Biomedicina.

Los experimentos de Gurdon consistieron en transferir el núcleo de una célula diferenciada (célula ciliada epitelial de intestino) de renacuajo del sapo con garras africano (*Xenopus laevis*) al citoplasma de un óvulo cuyo núcleo había sido destruido mediante radiación ultravioleta, obteniendo un sapo macho y otro hembra normales, aunque con una frecuencia pequeña (1%). Como comprobación experimental de que la técnica de transferencia nuclear había sido correcta, Gurdon utilizó como cepa donadora del núcleo un mutante nucleolar obtenido por Fischberg (Eldsdale et al., 1958), en cuyo

laboratorio había trabajado con anterioridad, que mostraba en el núcleo interfásico un solo 69osibili en lugar de dos que tenía la cepa receptora normal. Diez años más tarde, Kobel y colaboradores (1973) obtuvieron un sapo hembra fértil transfiriendo núcleos de células no ciliadas de epidermis de renacuajo, ratificando así las experiencias de Gurdon.

A pesar de la evidencia experimental aportada por Gurdon y la corroboración por Kobel y colaboradores, sin embargo, la clonación en anfibios por transferencia de núcleos de células diferenciadas fue recibida con cierto escepticismo por parte de la comunidad científica (Di Berardino y Hoffner, 1980) porque, como señala la propia Institución Nobel, el descubrimiento de Gurdon “hizo añicos el dogma de que la diferenciación celular sólo podía ser un proceso unidireccional” (Frisén et al., 2012). De hecho, la idea científica vigente entonces estaba muy enraizada con el modelo de canalización del desarrollo propuesto por Waddington (1957) en la década anterior en el que comparaba el proceso de desarrollo con un paisaje epigenético de montañas y valles en el que las células indiferenciadas están en las cumbres de las montañas y en el proceso de diferenciación entran en los valles de forma que ya no podrán volver al estado diferenciado que representan las cumbres. Otro ejemplo muy gráfico que solía utilizar yo en mis clases de Genética era el de los cambios de vía de una estación de tren donde se clasificaban los vagones llevándolos a las vías muertas de la diferenciación.

b) Mamíferos

Si en anfibios había sido posible la clonación por transferencia de núcleos, ¿por qué no podía ser posible también en mamíferos? Sin embargo, las investigaciones realizadas inicialmente en ratones dieron resultados negativos, dando pie a que se llegara a decir en palabras del mayor exponente en el campo de la investigación genética embriológica en ratón de aquella época que “la clonación por transferencia de núcleos en mamíferos es biológicamente imposible” (McGrath y Solter, 1984). Es obvio que términos como imposible, siempre o nunca no pueden ser usados en cuestiones científicas. De hecho, trece años más tarde, en 1997, la comunidad científica y la sociedad conocieron con perplejidad que en el Instituto Roslin de Edimburgo había nacido la oveja Dolly originada por transferencia del núcleo de una célula de glándula mamaria de una oveja adulta a un ovocito enucleado en una investigación dirigida por el Dr. Ian Wilmut (Wilmut et al., 1997). Este trabajo del grupo de Wilmut abrió las puertas a la clonación por transferencia de núcleos en mamíferos; así, hasta la fecha de hoy, se han obtenido animales clónicos en

otras muchas especies: ratón, vaca, mono, osibi, cabra, cerdo, gato, conejo, carnero “bateng”, mulo, caballo, rata, ciervo, perro, lobo, camello, toro de lidia, coyote. Cuando se conoció la noticia del nacimiento de la oveja Dolly, un periódico hacía un comentario con el titular “hoy la oveja, mañana el pastor” planteando el problema ético que supondría obtener humanos clónicos.

Como ha ocurrido en otras ocasiones, en el camino de la concesión de este Premio Nobel en Fisiología o Medicina 2012 ha habido algún damnificado: me refiero al Dr. Ian Wilmut (Roslin Institute, Universidad de Edimburgo, UK) y a su colaborador el Dr. Keith Campbell –fallecido unos días antes de la concesión del premio por lo que no hubiera podido recibir el galardón según las normas de la institución Nobel– que muy bien podría haber compartido el premio con el Dr. Gurdon reconociendo su mérito por la clonación de la oveja Dolly que abrió las puertas a la clonación en mamíferos.

1.2. Células troncales pluripotentes inducidas (iPS) (basado en Lacadena, 2011)

La *terapia celular*, basada en la transferencia de células o tejidos a los tejidos u órganos dañados, es una de las grandes esperanzas de la Medicina Regenerativa del futuro. El establecimiento de cultivos celulares de tejidos humanos en el laboratorio es a veces muy difícil. Por ello, desde el punto de vista clínico es innegable el avance que supondría la posibilidad de poner a punto técnicas que permitieran obtener cualquier tipo de cultivos de tejidos y, acaso en un futuro más lejano, de órganos. En este contexto, no cabe duda que el uso de las *células troncales* Puede resultar fundamental.

Por célula troncal se entiende cualquier célula indiferenciada que tiene la doble capacidad de dividirse de forma ilimitada y, en un cierto momento, diferenciarse dando lugar a diferentes tipos de células especializadas. De acuerdo con esta segunda capacidad, las células troncales pueden ser totipotentes, pluripotentes y multipotentes en razón a su mayor o menor versatilidad o potencialidad, tal como se definen a continuación:

- *Célula totipotente*: Célula troncal que tiene la capacidad de diferenciarse en el embrión y en tejidos y membranas extraembriónicas. Las células totipotentes contribuyen a todos los tipos celulares de un organismo adulto. La *totipotencia* es la capacidad funcional de una célula de dar lugar a un individuo completo tras un proceso de desarrollo normal. Las células totipotentes de un embrión muy

temprano tienen la capacidad de diferenciarse en membranas y tejidos extraembrionarios, en el embrión y en todos los tejidos y órganos postembrionarios. En el embrión humano, parece ser que solamente son totipotentes los blastómeros hasta el estadio de mórula de 16 células.

- *Célula pluripotente*: Célula troncal presente en los estadios tempranos de desarrollo embrionario (*blastocisto*) que puede generar todos los tipos de células en el feto y en el adulto y es capaz de autorrenovación. Las células pluripotentes, sin embargo, no son capaces de desarrollarse en un organismo completo. La *pluripotencia* es la capacidad funcional de una célula de dar lugar a varios linajes celulares o tejidos diferentes. Las células troncales embrionarias (ES) presentes en la *masa celular interna* (MCI) del blastocisto humano son pluripotentes, pero no totipotentes; es decir, pueden originar distintos tejidos u órganos pero no dar lugar al desarrollo completo de un embrión porque no pueden producir las membranas y tejidos extraembrionarios necesarios para el proceso de gestación. No obstante, podría ocurrir que una célula pluripotente de la masa celular interna se convirtiera en totipotente.
- *Célula multipotente*: Célula troncal presente en los tejidos u órganos adultos que tiene una capacidad limitada de reactivar su programa genético como respuesta a determinados estímulos que le permiten dar lugar a algunos, pero no todos, los linajes celulares diferenciados. La *multipotencia* es la capacidad funcional de una célula de dar lugar a alguno, pero no todos, los linajes celulares. Algunas células troncales presentes en tejidos u órganos adultos son multipotentes. A veces se utiliza el término *plasticidad* como equivalente a multipotencia.

Hay varias clases de células troncales (*embrionarias, adultas, pluripotentes inducidas*) cuya eficacia en el establecimiento de cultivos de tejidos en el laboratorio y sus valoraciones éticas y jurídicas son diferentes. Aunque los tres tipos de células troncales pueden tener una aplicación clínica, sin embargo, las células iPS son especialmente indicadas en la terapia celular de la Medicina Regenerativa porque al tratarse de una transferencia autóloga se evita el rechazo inmunológico. En el presente contexto únicamente se hará referencia a las células troncales pluripotentes inducidas (células iPS).

1.2.1. *Células troncales pluripotentes inducidas (iPS), una esperanza ética para el futuro* (ver revisiones por Hochedlinger y Plath, 2009; Izpisua, Ellis, Hochedlinger y Yamanaka, 2009; Hochedlinger, 2010; Yamanaka, 2012)

Células iPS de ratón

Desde el año 2003, el laboratorio de Yamanaka (Takahashi et al., 2003) estaba interesado en el estudio de los factores necesarios para mantener la pluripotencia de las células troncales embrionarias, identificando el gen *Nanog* (Mitsui et al., 2003) a la vez que lo hacía el grupo de Austin Smith (Chambers et al., 2003). A partir de entonces decidió investigar la posibilidad de inducir la pluripotencia en células somáticas. Conociendo el trabajo de Tada y colaboradores (Tada et al., 2001) en el que demostraron que la fusión de células somáticas con células ES induce la pluripotencia del núcleo somático, Yamanaka seleccionó un conjunto de 24 factores de transcripción como posibles candidatos para inducir la pluripotencia en células somáticas, descartando uno a uno los factores que no parecían capacitados para ello. Finalmente, en 2006 Yamanaka (Takahashi y Yamanaka, 2006) logró la reprogramación de células somáticas de ratón utilizando solamente cuatro genes reguladores de la transcripción (*Oct3/4*, *Sox2*, *c-Myc* y *Klf4*) que fueron capaces de convertir fibroblastos embrionarios de ratón en células troncales pluripotentes, por lo que se le puede acreditar la paternidad de la técnica (Yamanaka, 2007) que fue ratificada por el grupo de investigación de Rudolf Jaenisch (Maherali et al., 2007; Wernig et al., 2007). Posteriormente, Yamanaka refinó la técnica original (Okita et al., 2007). En 2009, María Blasco y colaboradores demostraron que es necesaria la presencia de la actividad telomerasa en la obtención de células iPS en ratón (Marion et al., 2009).

Pensando en una futura aplicación clínica de estas técnicas hay que señalar dos inconvenientes: en primer lugar, la utilización de un retrovirus como vector para introducir los genes reguladores que reprograman las células somáticas y, en segundo lugar, en el caso de Yamanaka, la utilización del proto-oncogén *c-Myc*, lo cual puede suponer un obstáculo para lograr la autorización para llevar a cabo la investigación clínica. De hecho, un 20% de los ratones implantados con células iPS desarrollaron teratomas cancerosos. Más tarde, Yamanaka y colaboradores (Maekawa et al., 2011) obtenían células iPS a partir de fibroblastos de ratón y humanos sustituyendo el factor c-

Myc por el factor de transcripción *Glis1* (de la familia de zinc finger 1), evitando el posible efecto dañino del proto-oncogén *c-Myc*. El factor Glis 1 promueve múltiples vías de reprogramación, tales como las Myc, Nanog, Lin28, Wnt, Essrb y la transición mesenquima-epitelial.

Para obviar estas dificultades clínicas se han introducido algunas mejoras técnicas: por ejemplo, Yamanaka y colaboradores (Okita et al.; 2008) obtuvieron las células iPS sin utilizar vectores virales en ratones. Para ello utilizaron la transfección repetida de dos plásmidos de expresión en fibroblastos de embriones, uno era portador de los ADNc (ADN complementario) de *Oct3/4*, *Sox2* y *Klf4* y el otro del de *c-Myc*. En las células iPS obtenidas no se produjo la integración del plásmido en el genoma, evitando la formación de teratomas. Por su parte, Jaenisch y colaboradores (Carey et al., 2009), con objeto de reducir el número de partículas virales necesarias para la reprogramación y por tanto disminuir el peligro de la mutagénesis inducida por la integración de ADN viral en el genoma, lograron que los cuatro factores de reprogramación *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* y *c-Myc* pudieran ser expresados a partir de un único promotor viral, generando células iPS tanto a partir de células embrionarias o adultas de ratón como a partir de queratinocitos humanos. Por otro lado, Melton y colaboradores (Huangfu et al., 2008) obtuvieron células iPS a partir de fibroblastos humanos utilizando solamente los factores *Oct4* y *Sox2*, evitando la presencia de los proto-oncogenes *Klf4* y *c-Myc* y sus posibles efectos dañinos. Incluso, más tarde, Schöler y colaboradores (Kim et al., 2009) demostraron que la presencia única del gen *Oct4* bastaba para obtener células iPS (que denominan 1FiPS) a partir de células troncales neuronales de ratón adulto.

Un nuevo avance en el tema de las células iPS se produjo en abril de 2009 cuando Ding y colaboradores (Zhou et al., 2009) lograron transformar células somáticas de ratón en células troncales pluripotentes inducidas (iPS) sin introducir en las células información genética alguna sino, simplemente, poniendo a las células en presencia de determinadas proteínas.

Células iPS humanas

El paso a la obtención de células troncales pluripotentes inducidas en la especie humana la realizaron casi simultáneamente el grupo de Yamanaka y el de Thomson. En 2007 Thomson y colaboradores (You et al., 2007) lograron reprogramar células somáticas adultas humanas (procedentes de prepucio de recién nacido y de piel de feto) y

convertirlas en células troncales pluripotentes, introduciendo en ellas mediante un vector viral cuatro genes (*Oct4*, *Sox2*, *Nanog* y *Lin28*) que regulan la transcripción (factores de transcripción). Estas *células troncales pluripotentes inducidas* (células iPS, *induced pluripotent stem cells*) tienen cariotipo normal, expresan actividad telomerasa, expresan marcadores celulares de superficie y genes que caracterizan a las células troncales embrionarias (ES) y mantienen el potencial de desarrollo para diferenciarse en células de las tres capas germinales primarias. La eficacia de la técnica es de una célula iPS obtenida por cada 10.000 células tratadas que, en términos prácticos, es muy alta.

La publicación del trabajo del grupo de Thomson fue simultánea con la del grupo de Yamanaka (Takahashi et al., 2007) quienes utilizando como vector un retrovirus introdujeron en células somáticas humanas (células de la piel de la cara de una mujer de 36 años y de tejido conectivo sinovial de un varón de 69 años) cuatro genes reguladores de la transcripción (*Oct3/4*, *Sox2*, *c-Myc* y *Klf4*) con una eficacia de una célula troncal pluripotente inducida (iPS) obtenida por cada 5.000 células de piel utilizadas en el tratamiento. Por su parte, Izpisúa Belmonte y colaboradores (Aasen et al., 2008) mostraron que la utilización de queratinocitos de cabello humano resultaba cien veces más eficaz y era el doble de rápido que cuando se utilizaban fibroblastos.

Como se ha indicado anteriormente, Melton y colaboradores obtuvieron en 2008 células iPS a partir de fibroblastos humanos utilizando solamente los factores *Oct4* y *Sox2*, evitando la presencia de los proto-oncogenes *Klf4* y *c-Myc* y sus posibles efectos dañinos.

En noviembre de 2010, Rossi y colaboradores (Warren et al., 2010) obtuvieron células iPS a partir de varios tipos de células humanas mediante ARNm sintético modificado (RiPS cells), evitando los peligros de los métodos integrativos de ADN (vectores virales) y logrando superar la eficacia de otros métodos diseñados anteriormente (por ejemplo, uso de proteínas). Ellos sintetizaron ARN modificado correspondiente a los cuatro factores de transcripción canónicos utilizados inicialmente por Yamanaka: *Klf4*, *c-Myc*, *Oct4* y *Sox2* y en un experimento posterior añadieron el ARN modificado correspondiente a un quinto factor (*Lin28* de Thomson). Los métodos utilizados no son mutagénicos y son altamente controlables. Además, la utilización de ARN modificado plantea la posibilidad de utilizar esta nueva tecnología para dirigir la diferenciación de las células iPS obtenidas (RiPS) en el tipo celular deseado. Por ejemplo, los mismos autores, utilizando ARN sintético modificado que codificaba para el factor de

transcripción miogénico *MYOD*, obtuvieron células miogénicas que originaban miotubos formados por miogenina y miosina.

Aplicación terapéutica en modelo experimental de ratón

En diciembre de 2007, el grupo de Jaenisch hizo público en la revista *Science* el éxito de la aplicación en ratones de la técnica de Yamanaka para el tratamiento de la anemia falciforme humana en un modelo de ratón utilizando células pluripotentes inducidas (iPS) mediante reprogramación de células de la piel (Hanna et al., 2007). Posteriormente, en 2009, Ward, Ma y colaboradores (Xu et al., 2009) lograron corregir también en ratones la hemofilia de tipo A (producida por mutación del factor VIII) de manera que al inducir un corte en la cola de ratones inyectados en el hígado con células iPS no sufrían daños importantes mientras que los ratones control no inyectados morían en pocas horas. Al año siguiente, en 2010, el mismo grupo lograba revertir la hiperglicemia en ratones diabéticos de tipos 1 y 2 mediante la obtención y transferencia de células beta pancreáticas a partir de células iPS (Alipio et al., 2010).

.En 2010, Yamanaka, Okano y colaboradores (Tsuji et al., 2010) obtuvieron neuroesferas “seguras” (que no inducen tumorigénesis) derivadas de células iPS que originaban *in vitro* neuronas, astrocitos y oligodendrocitos de ratón electrofisiológicamente funcionales. Además, cuando dichas neuroesferas “seguras” eran trasplantadas a la médula espinal de un ratón 9 días después de haberle producido el daño, se diferenciaban en los tres linajes celulares neurales sin formar teratomas ni tumores, participando en la remielización e inducción del recrecimiento axonal de las fibras serotoninérgicas, contribuyendo a la recuperación de la función locomotora.

Aplicación terapéutica en humanos

Estas investigaciones suponen un paso adelante esperanzador en la posible utilización de células iPS en la terapia celular humana del futuro, obviando los problemas éticos de la manipulación de embriones.

La aplicación terapéutica de las células iPS podría plantearse en tratamiento clínicos *in vivo* sobre los pacientes que necesitarán disponer de las garantías suficientes que eviten efectos secundarios nocivos como puede ser la producción de tumores o en experimentos de laboratorio *in vitro* según el modelo de “enfermedades en placa petri”

que permitan conocer los procesos de la enfermedad o realizar pruebas toxicológicas para el desarrollo de nuevos fármacos.

Efectivamente, en 2008, Eggan y colaboradores (Dimos et al., 2008) lograron mediante la técnica de inducción de células iPS generar *in vitro* a partir de fibroblastos de piel células nerviosas motoras en un paciente de 82 años que padecía esclerosis lateral amiotrófica (ELA), que son precisamente las células dañadas por la enfermedad. La técnica consistió en introducir en los fibroblastos los genes *Klf4*, *Sox2*, *Oct4* y *c-Myc* utilizando como vector un retrovirus. También Park y colaboradores indujeron la obtención de células iPS en casos de distrofia muscular y de la enfermedad de Huntington (Park et al., 2008).

Posteriormente, en 2009, Svendsen y colaboradores (Ebert et al., 2009) obtuvieron células iPS a partir de fibroblastos de piel de un niño afecto de atrofia muscular espinal (AME), enfermedad autosómica recesiva que suele manifestarse a partir de los 6 meses de edad y que produce la muerte del paciente en torno a los dos años. Las células iPS obtenidas generaban neuronas motoras defectuosas de manera que, como dicen los autores del trabajo, se pueden estudiar comparativamente con las células nerviosas homólogas producidas por la madre fenotípicamente sana del niño enfermo y poder así estudiar los mecanismos de la enfermedad. En la técnica se utilizaron los genes *Oct4*, *Sox2*, *Nanog* y *Lin28* que fueron introducidos en los fibroblastos utilizando como vector un lentivirus.

Las células iPS específicas del síndrome de Rett muestran una disminución en la densidad de espinas después de la diferenciación neuronal (Marchetto et al., 2010).

La diferenciación de hepatocitos a partir de células iPS en pacientes con deficiencia para la α 1-antitripsina produce una acumulación elevada de lípidos y glicógeno (Rashid et al., 2010).

En 2011, Izpisúa y colaboradores (Liu et al., 2011) obtuvieron células iPS sanas a partir de fibroblastos de piel de niños que padecían la enfermedad de Hunchinson-Gilford de envejecimiento prematuro (progeria) y que al ser rediferenciadas a células musculares lisas volvían a manifestar las características de la enfermedad (acumulación de progerina y desorganización de la lamina nuclear). Sus investigaciones pueden permitir estudiar las causas del envejecimiento *in vitro*.

Recientemente, también de han utilizado las células iPS en enfermedades de manifestación tardía como la ataxia espinocerebelar (Koch et al., 2011), la enfermedad de Alzheimer (Israel et al., 2012), la enfermedad de Huntington (The HD iPS Consortium, 2012) y la enfermedad de Parkinson: en 2012, Izpisúa y colaboradores (Liu et al., 2012) obtuvieron células iPS a partir de células de la piel de pacientes con la enfermedad de Parkinson comprobando que las células iPS presentaban una anomalía en la membrana nuclear semejante a la que presentaban las células de una muestra *post mortem* del cerebro de pacientes que habían padecido dicha enfermedad. También se han iniciado estudios con enfermedades complejas como la esquizofrenia (Brennand et al., 2011).

A modo de resumen, en el Cuadro siguiente se resumen las investigaciones más importantes descritas anteriormente indicando los autores y las fechas correspondientes:

CÉLULAS TRONCALES PLURIPOTENTES INDUCIDAS (iPS)

- *Células iPS en ratón:*
Yamanaka (2006, 2008); Jaenisch (2007, 2009); Schöler (2009); Blasco (2009); Ding (2009)
- *Células iPS humanas:*
Yamanaka (2007, 2011); Thomson (2007); Park (2008); Jaenisch (2008, 2009); Lowry (2008); Izpisúa Belmonte (2008); Melton (2008); Rossi (2010); Gage (2011)
- *Aplicaciones terapéuticas en ratón como modelo experimental:*
Anemia falciforme HbS (Jaenisch, 2007); hemofilia A (Ward y Ma, 2009); diabetes (Ward y Ma, 2010); lesiones en médula espinal (Yamanaka y Okano, 2010)
- *Aplicaciones terapéuticas en humanos:*
Esclerosis lateral amiotrófica, ELA (Eggan, 2008); distrofia muscular y enfermedad de Huntington (Park, 2008 y The HD iPSC Consortium, 2012); atrofia muscular espinal, AME (Svendsen, 2009); síndrome de Rett (Marchetto, 2010); deficiencia en α 1-antitripsina (Rashid, 2010); ataxia espinocerebelar (Koch, 2011); progeria (Izpisúa Belmonte, 2011); esquizofrenia (Brennand, 2011); enfermedad de Parkinson (Izpisúa Belmonte, 2012); enfermedad de Alzheimer (Israel, 2012)

La importancia del descubrimiento de la posibilidad de obtener células troncales pluripotentes inducidas (células iPS) por reprogramación celular de células somáticas

adultas mereció ser seleccionado por la revista *Science* (Kennedy, 2007) como el segundo de los diez descubrimientos científicos más importantes del año 2007 y como el más importante del año 2008. Consideraba la revista que la obtención de células iPS es el logro de “una hazaña largamente buscada de alquimia celular”: así como los antiguos alquimistas buscaban convertir metales vulgares en oro, los científicos actuales han logrado convertir células humanas diferenciadas en células iPS, el equivalente biológico del oro.

Al igual que le ha sucedido al Dr. Ian Wilmut con la clonación en relación con el galardón Nobel concedido al Dr. Gurdon que he comentado anteriormente, el Dr. James A. Thomson ha experimentado una situación análoga por partida doble. En efecto, la historia de las células troncales pluripotentes embrionarias empezó en 1981 cuando Sir Martin J. Evans –galardonado con el Premio Nobel en Fisiología o Medicina en 2007– logró aislarlas y cultivarlas a partir de embriones de ratón en fase de blastocisto (Evans y Kaufman, 1981). Años más tarde, en 1998, el grupo dirigido por James A. Thomson, de la Universidad de Wisconsin-Madison, consiguió aislar y mantener en cultivo células troncales embrionarias a partir de blastocistos humanos (Thomson et al., 1998), continuando de alguna manera lo que Evans había logrado en ratones en 1981 y abriendo un nuevo campo científico en la Medicina. Este año por segunda vez se ve privado el Dr. Thomson del galardón Nobel a pesar de haber obtenido casi simultáneamente con el Dr. Yamanaka las células troncales pluripotentes inducidas humanas. Como es sabido, la normativa de la Institución Nobel prohíbe dar el mismo premio a más de tres personas, de no tratarse de un colectivo u organización.

Los intentos de abrir las puertas a la clonación humana con fines terapéuticos (obtención de *embriones somáticos* por transferencia nuclear de células del propio paciente) puede que resulten innecesarios si llega a hacerse una realidad clínica la reprogramación de células somáticas adultas utilizando las técnicas de Yamanaka, Thomson y Jaenisch antes descritas. En este contexto cabe señalar que el Dr. Ian Wilmut, padre científico de la oveja Dolly, anunció que abandonaba la investigación en clonación terapéutica humana para pasarse a la utilización de la técnica de reprogramación celular de Yamanaka. También José B. Cibelli, uno de los pioneros de la clonación humana (Cibelli et al., 2001, 2002), se ha manifestado a favor de la nueva técnica de reprogramación

mientras que otros científicos siguen aferrándose a la investigación con células troncales embrionarias como a un clavo ardiendo.

Los defensores de continuar investigando con células troncales embrionarias humanas defienden su posición, argumentando que si no hubiera sido por estas investigaciones no se hubiera llegado a conocer el papel de los factores de transcripción *Oct3/4*, *Sox2*, *c-Myc*, *Klf4*, *Nanog* y *Lin28* en el proceso de reprogramación celular de células somáticas adultas.

En el presente contexto, es importante señalar que, según datos de los NIH de los Estados Unidos, en noviembre de 2012 se habían registrado en todo el mundo 4167 investigaciones clínicas con células troncales adultas (AS), 26 con células troncales embrionarias (ES) y 19 con células troncales pluripotentes inducidas (iPS) (11 en Estados Unidos, 4 en Francia, 3 en Israel y 1 en Irán). Desde el punto de vista ético resulta interesante resaltar que la comunidad científica parece dispuesta a evitar la utilización de células troncales de embriones humanos (0,6%); incluso, en Estados Unidos hay 11 investigaciones clínicas con células iPS frente a 8 con células ES.

1.3. Reprogramación directa

En la década de los sesenta del siglo pasado, Ernst Hadorn (1965) introdujo los conceptos de *determinación* y *transdeterminación* en sus estudios de genética del desarrollo en *Drosophila*. Según Hadorn, la diferenciación celular se inicia por el proceso de la *determinación* que programa la célula para su futuro comportamiento en el desarrollo. En unos casos la diferenciación celular es inmediata a su determinación mientras que en otros casos la determinación supone un estado celular reproducible propagado durante una fase indiferenciada más o menos larga hasta que en un momento dado esas células determinadas se diferencian. Se entiende por *herencia celular* a la propiedad individual de las células de mantener y transmitir su estado de determinación. Utilizando en su investigación discos imaginales de *Drosophila* (primordios celulares presentes en las larvas que durante la metamorfosis se transforman en estructuras específicas de la mosca adulta), Hadorn observó que ocasionalmente se podían producir cambios en la herencia celular, de manera que discos imaginales de una cierta estructura adulta (alas, patas, antenas, ojos, etc.) dan lugar a otra estructura. Al fenómeno que produce tales cambios en la herencia celular se le denomina *transdeterminación*.

La Institución Nobel (Frisén et al., 2012) recordaba estos datos científicos de hace casi medio siglo por analogía con los procesos de *reprogramación directa* o *transdiferenciación* que en la actualidad están llevándose a cabo utilizando técnicas semejantes a las establecidas por Yamanaka. Efectivamente, un nuevo paso conceptualmente diferente a la técnica de inducción de células troncales pluripotentes (iPS) de Yamanaka lo dio en 2008 el grupo de Douglas A. Melton (Zhou et al., 2008) al reprogramar *in vivo* células adultas de ratón (células exocrinas del páncreas) transformándolas directamente (*reprogramación directa* o *transdiferenciación*) en células beta pancreáticas capaces de producir insulina (islotos de Langerhans). Las células obtenidas son indistinguibles de las células beta pancreáticas endógenas, tanto en tamaño como en su forma y estructura. Para ello, utilizaron como vector un adenovirus en el que se habían incorporado tres factores de transcripción (*Ngn3*, *Pdx1* y *MafA*) que el grupo de Melton había identificado previamente como responsables de la diferenciación de las células beta pancreáticas. El experimento realizado con ratones *in vivo* mostró que las células beta obtenidas mejoraban sensiblemente la condición de hiperglicemia de los ratones diabéticos. No cabe duda que estos resultados son esperanzadores para tratar de curar en el futuro la enfermedad de la diabetes tipo 1 en humanos.

Más tarde, en 2010 y 2011, Wernig y colaboradores (Vierbuchen et al., 2010; Pang et al., 2011), partiendo de la hipótesis de que la expresión combinatorial de factores de transcripción específicos del linaje neural podría convertir directamente fibroblastos en neuronas, utilizaron un conjunto de 19 genes candidatos de los que solamente tres factores (*Ascl3*, *Brn2* también denominado *Pou3f2* y *Myt1l*) eran suficientes para convertir con rapidez y eficacia fibroblastos embrionarios y postnatales de ratón directamente en neuronas funcionales *in vitro*. Las células neuronales inducidas (iN) expresan múltiples proteínas específicas de neurona, generan potenciales de acción y forman sinapsis funcionales. Los autores señalaban que la generación de células iN a partir de linajes no neurales podría tener importantes implicaciones tanto en el estudio del desarrollo neural como en el diseño de modelos de enfermedades neurológicas y la Medicina regenerativa.

Bhatia y colaboradores (Szabo et al., 2010) lograron la conversión directa de fibroblastos humanos en células progenitoras hematopoyéticas que daban lugar a linajes granulocíticos, monocíticos, megacariocíticos y eritroides. También en 2010, Ieda y colaboradores (Ieda et al., 2010) transformaron *in vitro* fibroblastos en cardiomiocitos

utilizando tres factores de transcripción y en 2012 dos grupos de investigación distintos (Song *et al.*, 2012; Qian *et al.*, 2012) inducían *in vivo* la transformación directa de fibroblastos en cardiomiocitos de ratón utilizando los mismos tres factores de transcripción. Es importante resaltar que estas investigaciones muestran la posibilidad de lograr la transdiferenciación o reprogramación directa no sólo entre células dentro de una misma capa germinal, sino también entre células de capas germinales diferentes como es el caso de fibroblastos (mesodermo) a neuronas (ectodermo).

La nueva técnica de *reprogramación directa* se salta el paso intermedio de las células iPS por el que la célula tratada se revierte al estado de maduración de una célula para que sea pluripotente. Es evidente que se ha abierto un nuevo y esperanzador campo para la medicina regenerativa del futuro. Además, como en el caso de la utilización de las células troncales adultas (AS) y las células troncales pluripotentes inducidas (iPS), se obvian los problemas éticos que plantea la utilización de las células troncales pluripotentes embrionarias (ES).

1.4. Epigénesis

En el presente contexto, me parece interesante hacer un breve comentario sobre la epigénesis, teniendo en cuenta que su significado ha tenido algunas variaciones a lo largo del tiempo. La Genética del Desarrollo estudia los procesos genéticos que controlan el paso de cigoto a adulto. Las concepciones clásicas de *preformación* (Hartsoecker, 1695) y *epigénesis* (Wolff, 1759) encuentran una base genética en su sentido conceptual por cuanto, por un lado, el cigoto reúne ya en forma de ADN lo que ha de ser el nuevo individuo (preformación) y, por otro lado, esa información genética controla espacial y temporalmente los procesos que constituyen las sucesivas etapas del desarrollo como liberación de las potencialidades contenidas en la célula inicial única (epigénesis) (Lacadena, 1988 a).

En Embriología, por “epigénesis” – en contraposición a la “preformación”– se entiende la teoría de que las estructuras nuevas y los organismos se desarrollan a partir de una masa indiferenciada original de materia viva en el curso del desarrollo embrionario. Waddington (1939, 1940) definió la “epigenética” como la rama de la Biología que se ocupa del análisis causal del desarrollo, definiendo a su vez el “epigenotipo” como el sistema de desarrollo total que está compuesto por series de desarrollo interrelacionadas a través de las cuales se realiza la forma adulta de un

organismo y que comprende la totalidad de las interacciones entre los genes y entre los genes y el ambiente no genético que da como resultado el fenotipo (“epifenotipo”). El epigenotipo de una célula es un carácter estable y heredable, al menos durante muchas generaciones celulares, cuyo modo de impresión está por encima o además del genotipo clásico, esto es, la secuencia de bases del ADN (Rieger et al., 1976).

En tiempos recientes ha surgido dentro de la Genética un nuevo concepto de “epigenética” (Speybroek, 2002) en relación con los mecanismos genéticos que influyen en el fenotipo sin alterar las secuencias del ADN, siendo la metilación del ADN (generalmente de las citosinas) uno de los mecanismos epigenéticos más importantes (patrón de metilación del ADN o *metiloma*). Mecanismos epigenéticos son también las alteraciones de la estructura o remodelación de la cromatina por modificación de las histonas (metilación, acetilación, fosforilación) (Passarge, 2007). La estructura local de la cromatina es un estado epigenético que puede cambiar de forma reversible por diversos tipos de mecanismos (remodelación de la cromatina). El hecho de que la actividad génica diferencial –a la que hacíamos referencia al definir el concepto genético de desarrollo– no implique cambios en la secuencia original del ADN explica por qué son posibles los mecanismos de reprogramación celular tales como la clonación por transferencia nuclear y la inducción de células troncales pluripotentes que han sido objeto del Premio Nobel en Fisiología o Medicina 2012.

En mi opinión, la confusión que en ocasiones se produce en el debate actual sobre lo que se denomina el “estatuto del embrión humano” es que se argumenta que el simple programa genético que contiene el cigoto producido por la fecundación de los gametos es necesario pero no suficiente para que se realice el proceso de desarrollo ya que son necesarios también los fenómenos epigenéticos como, por ejemplo, el silenciamiento de la expresión de los genes por la metilación de su ADN, pero manteniendo la secuencia original del ADN que constituye el programa genético del organismo reunido en el cigoto tras el proceso de fecundación de los gametos.

e) Genética del Comportamiento

Como se ha indicado en un lugar anterior, en el proceso de desarrollo cabe distinguir los siguientes fenómenos o *componentes del desarrollo*: la *replicación genética*, la *proliferación celular*, la *citodiferenciación*, la *histogénesis* como resultado de la agregación de las células diferenciadas para constituir un tejido con función especializada,

la *organogénesis* como consecuencia de la asociación de tejidos que da como resultado final la forma del individuo (*morfogénesis*) y, finalmente, el *comportamiento* como última expresión multidimensional del desarrollo. En términos genéticos analógicos podría decirse que en el proceso de desarrollo se pasa de la información genética *unidimensional* contenida en la secuencia lineal de bases nitrogenadas de la molécula de ADN, a las hojas blastodérmicas *bidimensionales*, que tras un proceso morfogénético se transforman en el individuo *tridimensional* que exhibirá unas pautas de comportamiento *multidimensional* a lo largo de su vida (Lacadena, 1988, 1999).

Desde el punto de vista genético, el comportamiento es, quizá, uno de los componentes del desarrollo más difíciles de analizar, pero no por eso fuera del alcance de un control genético. Siguiendo al profesor Pinillos (1969), una definición sencilla para algo que puede ser tan complejo es definir el *comportamiento* como “*cualquier reacción a cualquier estímulo*”. Dentro de la escala evolutiva de los seres vivos el comportamiento se manifiesta a distintos niveles, incluyendo desde los *tropismos* y *taxias* más simples a las formas más complejas que se encuentran en los vertebrados como son los *reflejos*, los *instintos*, el *aprendizaje* y la *inteligencia* en sus distintos grados.

La *Genética del comportamiento* estudia el control genético de las acciones de los organismos, definiendo, por tanto, el comportamiento como “*cualquier reacción a cualquier estímulo*” (Lacadena, 1988). Las *dificultades* que presenta el *análisis genético del comportamiento* provienen fundamentalmente de tres fuentes: 1) la *ambigüedad* con que se establece en ocasiones el propio concepto de comportamiento, de manera que mal podremos analizar genéticamente algo sin saber a ciencia cierta lo que pretendemos estudiar; 2) la *distancia entre el fenotipo (la pauta de comportamiento) y el genotipo* que lo determina pues entre ambos media un complejo camino fisiológico que recorrer ya que la acción genética primaria puede afectar a los órganos sensoriales (receptores), cambiando la información recibida; al sistema intermediario nervioso o endocrino (conductores), alterando las capacidades de coordinación o percepción y a los órganos efectores musculares o glandulares, modificando la respuesta; 3) la *influencia del ambiente* en la manifestación del fenotipo que es la pauta de comportamiento: el fenotipo es la expresión del genotipo en un ambiente determinado, resultando difícil en muchos análisis genéticos del comportamiento discernir la importancia relativa de los componentes genético y ambiental.

Respecto a la metodología genética cabe decir que existen dos tipos de aproximaciones opuestas: partiendo de genotipos mutantes tratar de analizar las posibles variaciones del patrón de comportamiento (*método genotípico*) o bien, a partir de la variabilidad fenotípica de comportamiento observada, tratar de conocer su base genética (*método fenotípico*).

Los estudios genéticos del comportamiento humano se pueden sistematizar agrupándolos en cuatro apartados: la *percepción de los sentidos* (vista, oído, olfato, gusto y tacto), la *estructura de la personalidad*, la *inteligencia* y las *anomalías de la razón* (que pueden o no afectar a la capacidad intelectual). En lo que se refiere a la percepción de los sentidos, se han descrito desde hace mucho tiempo estudios genéticos sobre el daltonismo, la sordera, la sensibilidad para ciertos sabores, etc. Es obvio que en el presente contexto hay que mencionar el Premio Nobel en Fisiología o Medicina 2004 en relación con el sentido del olfato.

Aunque hace ya bastantes años (1973) la institución Nobel otorgó su premio a Karl von Frisch (lenguaje de las abejas), Konrad Lorenz (comportamiento instintivo en las aves como respuesta a estímulos clave) y Nikolaas Tinbergen (etología animal) “por sus descubrimientos sobre la organización y elucidación de los patrones de conducta individual y social”, que supusieron los fundamentos de la Etología, hubo que esperar hasta 2004 en que la Asamblea Nobel del Instituto Karolinska hacía pública la concesión del premio Nobel en Fisiología o Medicina conjuntamente a Richard Axel y Linda B. Buck “por sus descubrimientos de los receptores olfativos y la organización del sistema olfativo”.

Cuando los medios de comunicación dieron a conocer que el Premio Nobel de Fisiología o Medicina 2004 tenía que ver con el sentido del olfato, inmediatamente vino a mi mente la novela “El perfume” de Patrick Süskind escrita en 1985, que fue un gran éxito editorial en Alemania y traducida ese mismo año al español.

En las primeras páginas de su novela de género negro, Süskind relata el drama de un recién nacido llamado Jean-Baptiste Grenouille que, como no olía a nada, su horrorizada nodriza se negó a seguir criándole: “Si la cuestión tiene o no algo que ver con el demonio –le decía la nodriza al padre Terrier– no es asunto de mi incumbencia. Yo solo sé una cosa: que este niño me horroriza porque no huele como deben oler los lactantes”. A partir de ahí, la trama apasionante de la novela se desarrolla en función de que aquel

ser anómalo, que no olía a nada de recién nacido, sin embargo, tenía enormemente desarrollado el sentido del olfato porque poseía una nariz privilegiada que le permitía identificar a gran distancia, incluso a través de las paredes, cualquier efluvio. Esta condición le convirtió en un individuo maldito, en un monstruo.

No cabe duda que el olor es importante porque es capaz de identificar muchas cosas. Ya lo dijo Shakespeare: “Una rosa, con otro nombre, tendría el mismo aroma”. Por otro lado, al leer en “Hamlet”, también del mismo Shakespeare, la expresión “algo huele a podrido en Dinamarca” inmediatamente somos capaces de *recordar el olor* a podrido. ¿Por qué tenemos metidos los olores en el cerebro? Esa es la “lógica del olfato”, utilizando la expresión que dijera en 2001 Linda B. Buck, una de las personas galardonadas con este premio Nobel.

Como se indicaba en la comunicación oficial del Instituto Karolinska a la prensa, el sentido del olfato humano ha sido el más enigmático de nuestros sentidos, de manera que durante largo tiempo fueron desconocidos los fundamentos científicos básicos por los que se reconocen y recuerdan los 10.000 olores diferentes estimados.

Cada célula receptora olfativa posee un solo tipo de receptor olfativo y, a su vez, cada receptor puede detectar un número limitado de sustancias olorosas; es decir, cada una de nuestras células receptoras olfativas está altamente especializada para unos pocos olores.

Los estudios pioneros de Axel y Buck partieron de un trabajo conjunto que publicaron en 1991 en la revista *Cell* en el que describían en ratas la clonación y caracterización de 18 miembros diferentes de una familia multigénica extremadamente grande (posiblemente, varios centenares de genes) que codifica para siete dominios proteicos transmembrana cuya expresión está restringida al epitelio olfativo, concluyendo que la familia de genes descubierta codifica para receptores olfativos.

La estrategia experimental diseñada por Axel y Buck para aislar los genes que codifican para receptores olfativos la basaron en los tres supuestos siguientes: 1) los receptores olfativos deberían de pertenecer a la superfamilia de receptores proteicos que transducen señales intracelulares por acoplamiento a proteínas que se unen a GTP; 2) el elevado número de moléculas químicas olorosas diferentes que existe sugiere que los propios receptores olfativos deberían mostrar una gran diversidad y, consecuentemente,

estar codificados por una familia multigénica; 3) la expresión de los receptores olfativos debería estar restringida al epitelio olfativo.

La identificación en el epitelio olfativo de la superfamilia proteica con los siete dominios transmembrana se llevó a cabo por amplificación del ADN homólogo de los genes de la superfamilia génica mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir del ARN aislado de células del epitelio olfativo.

Con posterioridad a este trabajo pionero, Axel y Buck continuaron sus investigaciones de forma independiente, aunque a veces por rutas paralelas. Gracias a sus estudios llegaron a clarificar el sistema del olfato desde el nivel molecular al de organización topográfica celular. Por ejemplo, las neuronas olfativas que expresan un determinado receptor olfativo se proyectan con precisión a 2 de los 1.800 glomérulos dentro del bulbo olfatorio para crear un mapa topográfico de calidad olorosa. Pues bien, Axel y colaboradores (Wang *et al.*, 1998) demostraron que mutaciones por delección o mutaciones sin sentido del gen que codifica para el receptor olfativo P2 determinan que los axones de estas células se dispersen en lugar de converger sobre un glomérulo específico. Asimismo, la sustitución del gen P2 por la región codificadora del gen P3 da lugar a que los axones P3 → P2 se proyecten hacia un glomérulo cercano al glomérulo tipo P3. Sus conclusiones señalaban que el receptor olfativo juega un papel instructivo en el establecimiento del mapa topográfico.

Uno de los más recientes trabajos publicados por Axel en la revista *Nature* en colaboración con el grupo de Jaenisch (4 de marzo de 2004) fue el de la obtención de ratones clónicos obtenidos a partir de la transferencia de núcleos procedentes de neuronas sensoriales olfativas a ovocitos enucleados, demostrando que el patrón de expresión y organización de los genes de receptores olfativos no varía en los ratones clónicos en relación con los ratones normales (Eggan *et al.*, 2004).

Por otra parte, podemos mencionar también el trabajo de Buck y colaboradores (Zou *et al.*, 2001) quienes, utilizando ratones transgénicos obtenidos mediante la técnica de recombinación homóloga (*gene targeting*) en células troncales embrionarias, demostraron mediante experimentos de trazabilidad o seguimiento (*tracing*) genético la existencia de un mapa sensorial estereotipado en el cortex olfatorio del ratón. En cierta ocasión, Linda B. Buck dio una conferencia en el Instituto Karolinska durante el Nobel

Symposia del 7 de diciembre de 2001 sobre la “lógica del olfato”, sin duda como premonición del galardón máximo que iba a recibir tres años después.

En este contexto de los olores y el olfato, puede hacerse referencia también a las feromonas, moléculas que pueden influir en diferentes comportamientos sociales, especialmente en los animales, y cuyo papel evolutivo puede ser importante por cuanto afectan a la reproducción. Axel y Buck descubrieron, trabajando por separado, que las feromonas son detectadas por otras dos familias de receptores acoplados a la proteína G (GPCR) localizados en una parte diferente del epitelio nasal.

Permítaseme recordar, en este contexto, la importancia de los olores. Cuentan de Napoleón Bonaparte que cuando, estando en campaña, decidía volver a la retaguardia escribía a la emperatriz Josefina anunciándole su visita con varios días de antelación y rogándole que no se lavara durante ese tiempo. Algo similar sería el caso de los gitanos que les gusta el “olor de su hembra”, citándose lo sucedido con aquel gitano que quería agredir a un médico de un hospital porque habían obligado a duchar a su mujer y le habían quitado el “olor a hembra”.

3.4. ¿Cómo cambian los genes?

Junto a la propiedad de replicación, el material hereditario tiene también la propiedad esencial de *mutación* puesto que, si así no fuera, no hubiera habido evolución. La mutación es la fuente primaria de la variabilidad genética y como tal es indispensable para que tenga lugar el hecho evolutivo ya que éste se produce como resultado de la acción de la selección natural y del azar sobre la diversidad existente en las poblaciones.

a) Base molecular de la mutación

Conocido el flujo de información ADN→ARN→proteína, se infiere fácilmente que un cambio en la secuencia de bases del ADN de un gen puede originar, por lo general, un cambio en la proteína codificada que, a su vez, puede modificar el fenotipo del individuo. A nivel molecular, los tipos de cambios que pueden ocurrir se clasifican en sustituciones, adiciones o inserciones, deleciones, duplicaciones, inversiones y transposiciones.

Ya Watson y Crick (1953*b*) indicaron que su modelo estructural del ADN implicaba la posibilidad de que la mutación espontánea pudiera ser debida a que ocasionalmente una base se presente en su menos probable forma tautomérica; es decir, la timina y la guanina

en sus formas enólicas (en lugar de cetónicas) y la adenina y la citosina en sus formas imino (en lugar de amino). La tautomería, al cambiar la distribución espacial de los electrones de las moléculas hace posible el apareamiento complementario entre bases distinto al normal en el momento de la replicación del ADN, induciendo así sustituciones de unas bases por otras.

Las *inserciones* constituyen otro de los posibles mecanismos moleculares de mutación. Hoy día está demostrado que muchas de las mutaciones descritas y analizadas por métodos clásicos de la Genética están realmente producidas por la inserción dentro de un gen de un *elemento genético móvil* o *transposón* que, obviamente, modifica drásticamente la información genética original. Como ya he mencionado en un lugar anterior, fue Barbara McClintock quién profetizó la existencia de los elementos genéticos móviles en el maíz (McClintock, 1949, 1950, 1951, 1957); sin embargo, sus razonamientos fueron totalmente incomprendidos porque la comunidad científica no estaba preparada para comprender y aceptar sus ideas. Afortunadamente para ella, más de veinte años después, los descubrimientos posteriores de la Genética Molecular le dieron la razón (ver, por ejemplo, Bukhari *et al.*, 1977; Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 1980; Shapiro, 1983) y pudo recibir todavía en vida, a sus 81 años, el reconocimiento de la comunidad científica internacional cuando se le concedió en 1983 el premio Nobel “por sus hallazgos sobre la existencia de estructuras móviles en la masa genética”. El propio sistema *Ds-Ac* (*disociación - activador*) utilizado por McClintock en su análisis citogenético fue caracterizado molecularmente con posterioridad (ver Fedoroff, 1983, 1984). Desde el punto de vista citogenético hay que resaltar el posible papel de los transposones en los reordenamientos estructurales (Nevers and Saedler, 1977).

La personalidad científica de Barbara McClintock –adelantada a su tiempo- ha sido analizada por varios autores (Keller, 1983; Kahmann, 1992; Campbell, 1993; Fedoroff, 1994).

b) Mutaciones inducidas

El análisis genético convencional maneja alternativas alélicas de un locus, de manera que en el diseño experimental se parte del cruzamiento entre individuos que presentan genotipos distintos.

Durante casi treinta años estuvieron intentando los genéticos producir artificialmente las mutaciones sin conseguirlo, hasta que Hermann J. Muller demostró en 1927 los efectos mutagénicos de los rayos X en *Drosophila*. Al año siguiente, Stadler (1928a y b) confirmó los mismos efectos en material vegetal (maíz y cebada). Desde entonces el hombre ha tenido en su mano la posibilidad de imitar a la naturaleza en la producción de nueva variabilidad genética. En 1946 recibía Muller el premio Nobel “por su descubrimiento de la inducción de mutaciones mediante radiación con rayos X”. Además, desarrolló diversos métodos para estimar la tasa o frecuencia de mutación en *Drosophila*, utilizando cepas de moscas con constituciones citogenéticas adecuadas (Muller, 1928). Como colaborador de Morgan participó en el desarrollo de la teoría cromosómica de la herencia y en alguna de las primeras obras que establecieron un cuerpo de doctrina de la nueva ciencia Genética, como fue el libro “Mechanism of Mendelian heredity” (Morgan *et al.*, 1915).

Casi veinte años más tarde, Auerbach y Robson (1946) demostraban que el gas mostaza (sulfuro de β,β' -dicloroetilo) y sus derivados tenían un gran poder mutagénico, dando así paso a las sustancias químicas como otro gran grupo de agentes inductores de mutación, además de las radiaciones ionizantes y no-ionizantes (luz ultravioleta).

La mutagénesis experimental convencional es un proceso de azar en el sentido de que el investigador sabe de la eficacia de la técnica utilizada (qué tipo de radiación, a qué dosis, durante cuánto tiempo o qué sustancia química, a qué concentración, etc.), pero escapa a su control la posibilidad de dirigir la mutación; es decir, que el mutágeno utilizado afecte a un gen concreto que se desea modificar y, mucho menos aún, a una parte concreta de dicho gen. Sin embargo, el progreso de la tecnología molecular ha hecho posible el milagro. A final de la década de los setenta, Michael Smith y colaboradores (Hutchison *et al.*, 1978; Gillam and Smith, 1979a y b; Gillam *et al.*, 1979) introdujeron la técnica de *mutagénesis dirigida* basada en la utilización de oligonucleótidos sintéticos que alteran por apareamiento erróneo nucleótidos específicos de una determinada secuencia de ADN (ver revisión por Smith, 1985). De esta manera se pueden producir cambios predecibles en la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada por el gen mutado, permitiendo analizar cómo las diferentes partes o dominios de la proteína contribuyen a su función y, eventualmente, diseñar nuevas proteínas. Esta técnica ha revolucionado la investigación en los laboratorios de investigación y en las compañías biofarmacéuticas. Por ello no fue de

extrañar que Smith recibiera el premio Nobel de Química en 1993 “por su contribución fundamental al establecimiento de la mutagénesis dirigida mediante oligonucleótidos y su desarrollo para estudios de proteínas”, en palabras de la Real Academia de Ciencias sueca que le otorgó el premio.

Aunque no está relacionado directamente con el tema que nos ocupa, no resisto la tentación de hacer un comentario, aunque sea muy breve, sobre el impacto de la mutagénesis en la sociedad, que ya en otras ocasiones he tratado con mayor extensión (Lacadena, 1976, 1988, 1991a).

La variabilidad genética producida en las poblaciones naturales se debe a posibles errores ocurridos a escala molecular –por ejemplo, durante la replicación de la molécula de ADN- así como a la acción del medio ambiente sobre el ADN. A este tipo de cambios en el material hereditario se les llama *mutaciones espontáneas*. Frente a este tipo de alteraciones genéticas están las *mutaciones inducidas* producidas directa o indirectamente, con intención o sin ella, por intervención humana. En ocasiones, el hombre realiza tratamientos experimentales –como acabamos de ver- con el propósito de inducir mutaciones en los seres vivos con el fin de realizar estudios de genética básica o aplicada. Otras veces, sin embargo, la mutagenésis se induce por la acción de agentes físicos o químicos producidos y utilizados por la nueva tecnología. Las radiaciones, ciertas sustancias químicas y determinados sistemas biológicos constituyen los tres grupos en que se pueden clasificar los posibles agentes mutágenos.

De todos es conocido el efecto mutagénico de las radiaciones. Aunque en el medio ambiente en que vivimos estamos sometidos a la acción de una cierta radiactividad natural, está demostrado que dicha radiación ionizante no es lo suficientemente intensa como para producir las mutaciones espontáneas con las frecuencias detectadas en diversos organismos (del orden de 10^{-5}). Sin embargo, la tecnología moderna tiende a incrementar la utilización de la energía nuclear, resultando obvio deducir las graves consecuencias que se derivarían del uso indebido o de la ocurrencia de un accidente fortuito. Todos tenemos en la memoria el efecto devastador de las bombas atómicas lanzadas el 6 y el 9 de agosto de 1945 sobre Hiroshima y Nagasaki, o el accidente de la central nuclear de Chernobil, ocurrido en abril de 1986. Como decía Rostand en sus “Inquietudes d’un biologiste” (1967), “las explosiones nucleares hacen algo peor que matar: preparan la vida mala, ponen en

circulación genes defectuosos que van a proliferar indefinidamente... No sólo crimen futuro, sino crimen viviente, continuo, que se mantiene a sí mismo”.

A partir del trabajo pionero de Auerbach y Robson sobre el efecto mutagénico del gas mostaza, que fue publicado en 1946 porque los resultados positivos que habían obtenido antes fueron considerados secreto militar durante la Segunda Guerra Mundial, los estudios sobre mutagénesis química se intensificaron. El número de sustancias químicas que han demostrado tener poder mutágeno es enorme. Desde el punto de vista de su naturaleza química se pueden agrupar como agentes alquilantes (aziridinas y triazinas, mostazas nitrogenadas, epóxidos, 91osibilid y lactonas, sulfatos alquílicos, etc.), entre los que hay algunos –los supermutágenos- que destacan por su poderosa acción mutagénica (EMS, EES y NG); análogos de base; derivados del nitrógeno (91osibilid, hidroxilamina), etcétera.

Desde el punto de vista de su utilización por el hombre, los mutágenos químicos se pueden agrupar como pesticidas, productos industriales, alimentos y aditivos de la alimentación y fármacos y drogas.

Por la repercusión que tienen en la actividad humana en relación con el *riesgo ocupacional*, haré un breve comentario sobre los productos industriales, que incluyen una amplia gama de compuestos, tanto en lo referente a su estructura orgánica como a su aplicación industrial. La mayor parte son agentes alquilantes con diferentes grupos funcionales: aziridinas, mostazas, epóxidos, lactonas, nitrosaminas, sulfatos dialquílicos, etc. Por ejemplo, podríamos citar el formaldehído –que es muy utilizado, él o sus polímeros, en la fabricación de resinas sintéticas y en la industria textil y del papel-, el 91osibilid91 –utilizado como disolvente en las industrias del caucho, curtido de pieles y papel- o la acroleína utilizada en el acabado textil, tratamiento del papel, gomas químicas, plásticos, resinas sintéticas. Todos ellos, que además se encuentran en el humo del tabaco y de los automóviles, han demostrado ser mutágenos.

Otro tanto ocurre con algunos alimentos o aditivos de la alimentación. Por ejemplo, se ha demostrado que son mutágenos el EDTA (ácido etilen-diamino-tetracético), que se utiliza para conservación de alimentos que contienen grasas y aceites (mayonesa, margarina, etc.) por su acción antioxidante; el nitrito sódico, utilizado para conservar la carne, el pescado y el queso; el bisulfito sódico, utilizado como inhibidor bacteriano en la

fabricación del vino y la cerveza; el isotiocianato de alilo, utilizado como aditivo de salsas picantes, mostazas sintéticas, etc.

¿Y qué decir de los fármacos y las drogas? Muchos fármacos antineoplásicos, antibacterianos, antipiréticos, sedativos, etc. Han demostrado ser capaces de inducir mutaciones génicas y aberraciones cromosómicas.

Ante la situación descrita podríamos volver a recoger la preocupación de Jean Rostand (“Inquietudes d’un biologiste”, 1967) cuando se preguntaba: ¿quién dirá cuántas mutaciones nocivas se compran diariamente?

c) Reparación del ADN (basado en Lacadena, 2015)

El ADN, como material hereditario, tiene tres propiedades genéticas esenciales: es capaz de conservarse a sí mismo (*replicación*), es susceptible de cambiar (*mutación*) y es portador de información (*código genético*). Cualquier molécula química que constituyera el material hereditario en otro planeta de esta u otra galaxia tendría que tener forzosamente estas mismas tres propiedades. En efecto, el mecanismo de replicación del ADN asegura la conservación idéntica de la información genética de manera que al producirse la división celular en los organismos pluricelulares las células hijas conservan la misma información y el desarrollo no se convierte en un caos genético que haría inviable al organismo. No obstante, el proceso molecular de la replicación puede tener algún error. Por otro lado, la mutación es una propiedad genética esencial porque si no hubiera variabilidad genética no se podría haber producido el fenómeno de la evolución biológica, en cuyo caso no estaríamos nosotros aquí y ahora celebrando esta sesión científica. Esto quiere decir que el ADN es una molécula química inestable y que la existencia de cambios o mutaciones en el ADN es bueno para que la selección actúe en el proceso evolutivo. Sin embargo, sí sería muy perjudicial para la vida de los organismos que la frecuencia de cambios en la secuencia de bases del ADN fuera excesivamente elevada; de ahí la importancia de que en las células existan mecanismos que corrijan los daños genéticos producidos en el ADN ya sea por la propia inestabilidad química de la molécula en el ambiente celular normal ya sea por acción de agentes externos de naturaleza física (por ejemplo, los rayos X y rayos UV) o de naturaleza química (agentes alquilantes, pesticidas, derivados industriales, aditivos de la alimentación, etc.).

La importancia del estudio de los mecanismos de reparación del daño genético ha llevado a la Real Academia de Ciencias de Suecia, con sede en Estocolmo, a otorgar el 7 de octubre pasado el Premio Nobel en Química 2015 a los doctores Tomas Lindahl, Paul Modrich y Aziz Sancar por sus “estudios sobre los mecanismos de reparación del ADN”. Casi me atrevería a decir que se trata de un retorno a los primeros tiempos de la Genética en la era de la Genómica porque, ciertamente, la investigación sobre la mutación en la historia de la Genética puede decirse que se iniciaron hace casi noventa años cuando Muller, en 1927, demostró que los rayos X producían mutaciones, aunque en aquella época ni siquiera se conocía la base molecular de la herencia; es decir, no se sabía que los genes son ADN. En 1946, Muller recibió el Premio Nobel en Fisiología o Medicina “por su descubrimiento de la inducción de mutaciones mediante radiación con rayos X”.

Siguiendo el informe hecho público por la Real Academia Sueca de Ciencias (Gustafsson, 2015), se puede resumir que, “Lindahl demostró que el ADN es una molécula inherentemente inestable sujeta a degradación incluso bajo condiciones fisiológicas, identificando después un grupo totalmente nuevo de ADN glicosidasas y describiendo su papel en la *reparación por escisión de bases*. Por su parte, Sancar transformó el campo de la *reparación por escisión de nucleótidos* desde la genética y los fenómenos en extractos celulares a una detallada descripción molecular de los mecanismos implicados en bacterias y en células eucarióticas. Además, Sancar también explicó los mecanismos moleculares que subyacen en el proceso de *fotorreactivación*, que fue la primera forma descrita de reparación del ADN. Finalmente, Modrich transformó el campo de la *reparación del apareamiento erróneo (mismatch repair)* desde las observaciones genéticas a una detallada comprensión bioquímica, primero en bacterias y más tarde en células eucarióticas.

1. *Fotorreactivación*

Aunque desde hacía muchos años antes se sabía que la luz ultravioleta (UV) inducía mutaciones y afectaba a la viabilidad de las células, no fue hasta 1949 cuando Kelner demostró que la luz visible podía estimular el crecimiento de las células bacterianas que había sido detenido tras la exposición a la luz UV (Kelner, 1949). El fenómeno, que fue denominado *fotorreactivación*, suponía la existencia de algún mecanismo celular dependiente de la luz visible que podía corregir el daño celular ocasionado por la luz UV. Más tarde, en los años 1958 y 1960, Rupert demostró la existencia de una actividad

enzimática –denominada *fotoliasa*- que estaba presente en extractos acelulares de *Sacharomyces cerevisiae* y de *Escherichia coli* (Rupert, 1960). Dieciocho más tarde, en 1978, el galardonado Aziz Sancar, haciendo la tesis doctoral bajo la dirección de Rupert, logró clonar el gen de la fotoliasa de *Escherichia coli*, amplificando el producto génico *in vivo* (Sancar y Rupert, 1978). Tras unos años de interrupción, Sancar retomó la investigación sobre la fotoliasa y su mecanismo de reacción, demostrando en 1987 que la enzima puede convertir la energía de un fotón absorbido en energía química que produce un radical libre localizado que inicia la rotura del dímero de timina inducido por la luz UV. El mecanismo de fotoreactivación no existe en células de mamífero que, sin embargo, disponen de un mecanismo de reparación por escisión de nucleótidos (que será descrito en otro apartado) que corrige el daño producido por la radiación UV.

2. Reparación por escisión de bases

En la década de los setenta del siglo pasado, Tomas Lindahl (Lindahl y Nyberg, 1972) demostró que, aún en condiciones fisiológicas normales, el ADN está sometido a una serie de reacciones químicas tales como la desaminación, la oxidación y la metilación no enzimática que degradan el ADN (*ADN decay*) modificando las bases nitrogenadas y dando lugar a mutaciones. Lindahl demostró que ocurre con elevada frecuencia la desaminación de la citosina, transformándose en uracilo que, al ser capaz de aparearse con la adenina, da lugar tras la replicación del ADN a la sustitución de pares de bases citosina-guanina por adenina-timina en las cadenas complementarias (Lindahl y Nyberg, 1974).

Ante la frecuencia con que ocurre este proceso en condiciones fisiológicas normales, Lindahl pensó que tenían que existir mecanismos enzimáticos que corrigieran los posibles errores, demostrando la existencia en *Escherichia coli* de una uracil-ADN glicosidasa (Lindahl, 1974) que resultó ser la primera proteína de reparación del ADN conocida. Puede decirse que esta enzima fue el miembro fundador de una gran familia de proteínas que actúan en el proceso conocido como *reparación por escisión de bases (BER)*. Lindahl demostró también que el armazón estructural del ADN permanecía intacto durante el proceso de reparación lo cual implicaba la existencia de otra clase de enzimas: las apurin/apirimidin nucleasas. Finalmente, varios años más tarde, Lindahl pudo reconstituir el proceso BER, tanto en *Escherichia coli* (Dianov y Lindahl, 1994) como en células humanas (Kubota et al., 1996).

3. Reparación por escisión de nucleótidos

La radiación UV produce la dimerización de dos pirimidinas consecutivas en la misma cadena del ADN. De las tres combinaciones posibles C-C, C-T y T-T, la dimerización de las timinas (T-T) es la más frecuente. Esta anomalía estructural del ADN afecta a los procesos normales de replicación y de transcripción, dando lugar a mutaciones deletéreas (Setlow y Setlow, 1962).

Además del mecanismo de fotorreactivación antes descrito, se demostró que había otros mecanismos de reparación del ADN que eran independientes de la luz visible, denominándose *reparación oscura*. En 1964, Setlow y Carrier demostraron que los dímeros de timina originados por la luz UV desaparecían poco después de las grandes moléculas de ADN, apareciendo, en cambio, en fracciones de ADN de bajo peso molecular, lo cual les permitió postular que los dímeros de timina habían sido escindidos de la molécula original de ADN gracias a un mecanismo de escisión. De ahí el nombre de *reparación por escisión de nucleótidos (NER)*.

La investigación de las enzimas implicadas en la NER empezó por la identificación en 1966 de los genes *uvrA*, *uvrB* y *uvrC* cuyas mutaciones impedían la reparación del daño genético producido por la radiación UV (Howard-Flanders et al., 1966). La identificación de las correspondientes proteínas fue posible gracias a la técnica "maxicell" puesta a punto en 1979 por el galardonado Aziz Sancar (Sancar et al., 1979). Posteriormente, en 1983, Sancar utilizó las proteínas purificadas UvrA, UvrB y UvrC para describir las fases esenciales de la NER (Sancar y Rupp, 1983): las proteínas hidrolizan dos enlaces fosfodiéster en la hélice dañada del ADN. Las incisiones se producen en lugares precisos: una, en el octavo enlace fosfodiéster en el extremo 5' y, otra, en el cuarto o quinto enlace fosfodiéster en el extremo 3', dando lugar a un fragmento escindido de unos 12 o 13 nucleótidos. Posteriormente, el segmento escindido es reemplazado por una nueva síntesis de ADN: es el mecanismo denominado *cortar y parchear*.

Las células de mamíferos tienen también un sistema de cortar y parchear análogo al de las bacterias con la diferencia de que intervienen en el proceso más de quince proteínas en lugar de las tres del sistema bacteriano.

4. Reparación del apareamiento equivocado (*mismatch repair*)

Decíamos antes que la replicación del ADN debe conservar con exactitud la secuencia de bases en las moléculas hijas. Por ello la propia ADN polimerasa tiene además una función exonucleasa 3'→5' –llamada función “correctora de pruebas”-descrita en 1972 por Arthur Kornberg (Burtlag y Kornberg, 1972) que repara cualquier apareamiento equivocado (*mismatch repair*) que pueda producirse durante la replicación al incorporar alguna base nitrogenada no complementaria (recordemos la complementariedad adenina-timina y guanina-citosina). Sin embargo, se ha estimado que, a pesar de la función “correctora de pruebas”, los errores de apareamiento durante la replicación ocurren con una frecuencia de 5×10^{-5} por cada par de bases. Gracias a la existencia de otros mecanismos de reparación se ha estimado que, por ejemplo, en células germinales humanas, la tasa de mutación por cada par de bases nitrogenadas desciende hasta un 1×10^{-8} . Como señala el informe de la academia sueca, el doctor Paul Modrich “transformó el campo de la reparación del apareamiento equivocado (*mismatch repair*) desde las observaciones genéticas a una comprensión bioquímica detallada, primero en bacterias y más tarde en células eucarióticas”.

La historia genética de la “reparación del apareamiento equivocado (*mismatch*)” se remonta a los años cincuenta cuando Lindegren (1953) observó en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* que la segregación meiótica de un núcleo *Aa* no segregaba en la proporción $2A:2a$ sino en la proporción $3A:1a$, dándole el nombre de *conversión génica* propuesto por Winkler en 1930 para explicar el cambio de un estatus alélico a otro en el heterocigoto *Aa*; es decir, *A* se transforma en *a* o bien *a* se transforma en *A*. Posteriormente el fenómeno de la conversión génica se relacionó con el proceso molecular de la recombinación, concluyendo finalmente en el modelo propuesto en 1964 por Holliday que incluye la formación de “ADN híbrido” o heterodúplex (apareamiento equivocado, *mismatch*) que puede ser corregido enzimáticamente..

Investigaciones previas llevadas a cabo por diversos autores habían puesto en evidencia en la década de los setenta del siglo pasado que

- la reparación de dos o más apareamientos incorrectos de bases en el heterodúplex se produce normalmente en la misma cadena de la doble hélice, permitiendo así la reparación de tramos largos del ADN (Wagner y Meselson, 1976);

- la maquinaria de reparación era guiada de alguna manera a la nueva hélice sintetizada por la propia maquinaria replicativa o bien por la no metilación durante un cierto tiempo de la nueva hélice en determinadas sedes (metilación de la adenina en la secuencia GATC) (Marinus, 1976);
- la pérdida de la metilasa de ADN aumenta la frecuencia de mutación en *Escherichia coli* (Marinus y Morris, 1975);
- se identificaron los genes (*mutH*, *mutL*, *mutS*, y *uvrD*) necesarios para que se realice la corrección del apareamiento de bases incorrecto dependiente de la metilación del ADN (Glickman y Radman, 1980).

Con estos antecedentes, Paul Modrich presentó en 1983 la evidencia directa del mecanismo de reparación dirigido por la metilación del ADN, demostrando que la actividad reparadora depende del ATP y del estado de metilación del heterodúplex y que las mutaciones de los genes *mutH*, *mutL*, *mutS* y *uvrD* impiden la reparación del apareamiento de bases incorrecto en extractos acelulares de *Escherichia coli*. Posteriormente, aisló los productos de los genes implicados en la reparación, identificando las proteínas correspondientes y analizando sus propiedades en un sistema *in vitro*. Finalmente, en 1989 publicó un trabajo fundamental (Laue, Au y Modrich, 1989) en el que explica el funcionamiento del sistema de reparación en un sistema *in vitro*. En primer lugar, demostró el requerimiento de las enzimas ADNpol III, exonucleasa I y ADN ligasa, combinándolas con las proteínas MutH, MutL, MutS, UvrD y una proteína de unión al ADN monocatenario. Todos estos factores juntos pueden procesar *in vivo* los errores de apareamiento de bases actuando sobre la hélice adecuada de ADN dirigidos por la secuencia GATC hemimetilada (sólo esta metilada la adenina de la hélice molde) que está localizada a cierta distancia del apareamiento erróneo. El papel de las distintas proteínas es el siguiente: MutS reconoce y se une al par de bases no complementarias; MutH confiere la especificidad de la hélice de ADN uniéndose a la sede hemimetilada GATC de la hélice naciente. MutL actúa como mediador interactuando con MutH y MutS, transduciendo señales desde MutS que originan la activación de la actividad endonucleasa de MutH produciendo una rotura en la hélice naciente de ADN cerca de la sede GATC hemimetilada. A continuación, la helicasa UvrD separa las dos hélices de ADN hacia el lugar donde está el apareamiento erróneo, deteniéndose una vez pasado el par de bases equivocado. La hélice sintetizada es reemplazada mediante una reacción de relleno del hueco en la que la ADNpol III usa la hélice parental como molde.

Posteriormente, Modrich demostró que el sistema de reparación también funciona en células eucarióticas y humanas, aunque con ciertas variaciones.

5. Reparación del ADN y cáncer

Un comportamiento defectuoso de los sistemas de reparación del daño genético (reparación por escisión de bases o de nucleótidos o de apareamiento incorrecto de bases u otros) cambia la información genética de las células y puede aumentar el riesgo de cáncer. Es bien conocido el caso de la enfermedad humana conocida como *xeroderma pigmentosum* que produce alteraciones en la pigmentación de la piel debido a un fallo en el sistema de reparación por escisión de nucleótidos; pues bien, las personas con esta enfermedad son extraordinariamente sensibles a la radiación ultravioleta y pueden desarrollar cánceres de piel con una alta probabilidad. También se ha demostrado que la actuación defectuosa del sistema de reparación del apareamiento incorrecto de bases aumenta el riesgo del cáncer de colon y puede ser hereditario. Por otro lado, dado que las células cancerosas tienen su ADN más inestable se está tratando de atacarlas disminuyendo su capacidad de reparar el ADN mediante fármacos que inhiben los sistemas de reparación como es el caso del medicamento *olaparib*.

3.5. ¿Cuál es el destino de los genes?

Desde el punto de vista genético y biológico, no cabe la menor duda de que el papel de los genes en la evolución –su destino en el espacio y en el tiempo- es un tema importante. Sin embargo, en la historia genética de los premios Nobel –que es el objeto del presente estudio- no ha habido ninguno que tuviera que ver con este tema.

Posiblemente habría que pensar que las instituciones responsables de la propuesta y de la concesión de los premios consideren la problemática evolutiva alejada de las áreas de Fisiología y Medicina o de Química. Sin embargo, a este respecto, me gustaría recordar las palabras de Dobzhansky (1973) cuando decía que “nada en Biología tiene sentido si no es a la luz de la evolución” y que su discípulo Francisco J. Ayala (1980) parafraseó diciendo que “nada en la Biología es comprensible si no es a la luz de la Genética”. Incluso, al justificar la concesión del premio Nobel de Fisiología o Medicina a Lewis, Nüsslein-Volhard y Wieschaus por sus estudios sobre el control genético del desarrollo embrionario temprano en la mosca *Drosophila melanogaster*, la institución Karolinska reconocía la transcendencia de tales investigaciones por su extrapolación y aplicabilidad al embrión humano, ya que la

evolución ha conservado informaciones genéticas semejantes en ambos organismos durante cientos de millones de años. Con este ejemplo quiero defender la idea de que también los aspectos evolutivos podrían ser objeto de consideración de posibles premios Nobel.

Otro tanto podríamos decir de las investigaciones en torno al origen de la vida, desde el punto de vista de la evolución química (síntesis prebiótica) o de la evolución del “mundo del ARN” y del “mundo de las ribonucleoproteínas” que llevó al “mundo del ADN” y a la aparición del *progenote* como precursor de los *urcariotas*, las *eubacterias* y las *arqueobacterias* (Pace *et al.*, 1986; Orgel, 1987; Joyce, 1989). Hasta hace relativamente poco tiempo fue un círculo vicioso del “huevo y la gallina” el establecer científicamente que fue antes si los ácidos nucleicos o las proteínas, si el ADN o el ARN, puesto que desde la perspectiva actual de nuestro mundo biológico no sería fácil comprender cómo se puede sintetizar el ADN o el ARN si no hubiera enzimas (proteínas) y, a su vez, éstas no podrían existir si no se produjeran unos procesos de síntesis de proteínas que parten de un mensaje codificado en forma de ácidos nucleicos. El nudo gordiano del círculo vicioso se rompe en el momento en que se acepte que el sistema genético actual es el resultado de la evolución de un sistema genético prebiótico anterior al ARN del que se originó el “mundo del ARN” que evolucionó hacia otro de las ribonucleoproteínas a partir del cual surgió, por fin, el “mundo del ADN” en el que se produjo ya la evolución celular y de los organismos, como hemos mencionado anteriormente.

Posiblemente, el descubrimiento de la actividad catalítica del ARN por los premios Nobel Altman y Cech antes citados pueda representar la espada que rompió el nudo gordiano. Un dato experimental adicional que, de alguna manera, confirmaría las especulaciones en torno al tema fue aportado por Doudna y Szostak (1989) quienes demostraron que un derivado de la ribozima de Cech tenía propiedades de replicasa, catalizando la unión de múltiples oligonucleótidos alineados sobre un molde externo (ver Orgel, 1994).

Aunque, nuestro conocimiento de la transición prebiótica al “mundo del ARN” está plagado de incertidumbres por falta de datos experimentales, es hora –como señalaba Joyce (1989)- de situar la evolución del ARN en el contexto de la química que le precedió y de la biología que le siguió. Por ello pienso que, en términos de evolución del aparato genético, habría que gritar, parafraseando la antigua fórmula de proclamación de los reyes en la

monarquía francesa: el ADN ha muerto, ¡viva el ARN! (Lacadena, 1991*b*). En este contexto es, sin embargo, importante señalar que empieza a apuntar la posibilidad de que también el ADN pueda reunir la doble propiedad de almacenar información y catalizar reacciones (desoxirribosima) tal como señalan Cuenod y Szostak (1995).

De hecho, fue a partir de las investigaciones de Cech y Altman, cuando Szostak decidió cambiar el rumbo de sus investigaciones que, como se ha mencionado en un lugar anterior le valieron el Premio Nobel en Fisiología o Medicina 2009, planteándose la posibilidad de que el ARN existiera mucho antes que el ADN y las proteínas puesto que podría ser capaz de catalizar su propia replicación. En 1991, Szostak y sus colaboradores dieron un giro de 180 grados en sus investigaciones centrando su trabajo en el estudio de la evolución en el tubo de ensayo de moléculas funcionales de ARN y otras moléculas. Para ello pusieron a punto la técnica de “selección *in vitro*” para estudiar la evolución de moléculas biológicas para funciones predeterminadas, como la capacidad de catalizar una reacción química específica o unirse a una molécula diana.

Sería de desear que Jack W. Szostak pudiera recibir en el futuro otro premio Nobel por sus estudios sobre el origen de la vida. En el contenido formal de la Genética que consiste en dar respuesta a las preguntas sobre los genes: ¿qué son? ¿cómo se organizan y transmiten? ¿cómo y cuándo se expresan? ¿cómo cambian? ¿cuál es su destino en el espacio y en el tiempo?, solamente las investigaciones encaminadas a responder a la última cuestión no han sido galardonadas todavía con algún premio Nobel. Ojalá Szostak sea acreedor del galardón Nobel y rellene ese vacío. Yo, particularmente, me siento satisfecho de que mi intuición me llevara a relacionar hace ya 14 años a Szostak con los premios Nobel y el origen de la vida (Lacadena, 1995).

4. EL MÉTODO CIENTÍFICO EN GENÉTICA Y LOS PREMIOS NOBEL

El método científico hipotético-deductivo implica el planteamiento de una hipótesis –basada en y coherente con datos previamente conocidos- que debe ser sometida a rigurosas pruebas experimentales. Los resultados obtenidos conducirán al planteamiento de nuevos experimentos para contestar los nuevos interrogantes surgidos.

La regla de oro de la investigación biológica, extensible obviamente a la investigación genética, se basa en tres puntos: qué pregunta o problema se trata de resolver, en qué material biológico y mediante qué técnica. No hay duda que si un investigador quiere llegar a premio Nobel habrá de plantearse una pregunta importante y, a partir de ahí, decidir cuál es el organismo más adecuado para abordar el problema y si dispone de la técnica necesaria. Veamos cómo se ha aplicado en la historia de la Genética la regla de oro de la investigación (Ver el [CUADRO 4.1](#)).

4.1. La pregunta

Como se ha venido exponiendo a lo largo del presente estudio, las preguntas planteadas en el desarrollo del contenido formal (concepto) de la Genética han sido importantes: ¿qué son los genes? ¿cómo se organizan y transmiten? ¿cómo y cuándo se expresan? ¿cómo cambian? ¿cuál es su destino? La respuesta a todas ellas –excepto la última- han sido ocasión de numerosos premios Nobel, como hemos visto anteriormente.

4.2. El material biológico

En su trabajo sobre “Hibridación en plantas”, Mendel (1866) decía, en lo que hoy llamaríamos “Material y Métodos” de una publicación moderna, que “el valor y la utilidad de un experimento dependen de lo apropiado que sea el material para el objeto con que se emplea y, por ello, en el caso que nos ocupa no carece de importancia qué plantas se emplean para experimentar...”, y a continuación indicaba las condiciones que debían reunir: “Las plantas experimentales –decía Mendel- deben necesariamente poseer caracteres diferenciales constantes..., estar protegidas de la influencia de polen extraño... y no presentar perturbaciones en la fertilidad de los híbridos y su descendencia”, añadiendo a continuación que: “...En un principio se prestó especial atención a las leguminosas, debido a su peculiar estructura floral. Se hicieron experimentos con varios miembros de esta familia que condujeron al resultado de que el género *Pisum* posee las cualidades

necesarias". Y así fue como el guisante, *Pisum sativum*, se convirtió en el material biológico "fundador" de la Genética.

Al redescubrimiento de las leyes de Mendel en 1900 siguió una investigación masiva para comprobar si las hipótesis propuestas eran de aplicación universal. Así, cabe señalar, entre otras, las investigaciones de Cuénot (1902) con ratones, Bateson con gallinas (Bateson and Saunders, 1902) y las del premio Nobel Morgan y su escuela (Morgan *et al.*, 1915) con *Drosophila melanogaster*, que fue durante muchos años el organismo animal básico de la investigación genética: la "reina fundadora", en palabras de Dobzhansky. Aquí habría que recordar también la importancia de *Drosophila* en los estudios del control genético de la morfogénesis en el desarrollo embrionario que les valió el premio Nobel en 1995 a Lewis, Nüsslein-Volhard y Wieschaus.

Cuando, al término de la etapa cronológica de la "Genética de la transmisión" (1866-1900-1940), se planteó Beadle abordar el problema del modo de acción de los genes introdujo -como ya he comentado anteriormente- dos innovaciones importantes en la investigación genética: por un lado, analizar los genes que controlan las reacciones químicas y, por otro lado, utilizar los hongos como nuevo material biológico. El propio Beadle (1958), en su discurso de recepción del premio Nobel y haciendo referencia y reconociendo el mérito de Garrod, dijo: "Nosotros... éramos conscientes de que poco, si algo, habíamos añadido en principio. Estábamos trabajando con un organismo más favorable y éramos capaces de producir, casi a voluntad, errores congénitos del metabolismo [mutantes nutricionales]... lo que Garrod había mostrado para unos pocos genes y unas pocas reacciones químicas en el hombre, era cierto para muchos genes y muchas reacciones en *Neurospora*".

A final de la década de los años treinta y principio de los cuarenta se introducen en la investigación genética de la mano de Max Delbrück y colaboradores los virus y las bacterias. Un primer paso fue el estudio cuantitativo de la interacción fago-bacteria que establecieron Ellis y Delbrück (1939) mediante la técnica denominada de *crecimiento en escalón (one-step growth experiment)* que permite analizar la tasa de multiplicación de los fagos.

El paso siguiente lo dieron Salvador E. Luria y Delbrück en 1943. Como dicen Stent y Calendar (1978) en su obra narrativa de la Genética Molecular, "lo mismo que el nacimiento de la Genética tuvo lugar en 1865 con la publicación del trabajo de Mendel, el

nacimiento de la Genética Bacteriana tuvo lugar en 1943 con la publicación por Luria y Delbrück de su trabajo «Mutations of bacteria from virus sensitivity to virus resistance». Ello no quiere decir que el trabajo de Luria y Delbrück fuera el primer estudio sobre mutación en bacterias, como tampoco Mendel fue el primero que utilizó el cruzamiento artificial entre plantas para estudiar la herencia; pero en su investigación, Luria y Delbrück hicieron por la Genética Bacteriana lo que Mendel por la Genética: indicar el tipo de experimentación, la forma de manejar los datos obtenidos y, sobre todo, la complicación que requiere la obtención de resultados significativos y concretos”.

De poco hubieran servido los virus y las bacterias en la investigación genética si no se hubiera podido estudiar sus mutaciones mediante el análisis de la recombinación. El descubrimiento de la recombinación en los fagos lo hicieron en 1946 Delbrück y Bailey, por un lado, y Alfred D. Hershey, por otro; si bien el primer estudio completo se debe a éste último (Hershey and Rotman, 1949). Recordemos, además, que Hershey y Chase (1952) demostraron que la información genética de los virus está en su ADN y no en las proteínas. En 1969, Delbrück, Luria y Hershey recibieron el premio Nobel “por sus descubrimientos sobre el ciclo de reproducción de los virus y el papel del material genético en las bacterias y los virus”. Aquí me parece oportuno volver a citar a André Lwoff, premio Nobel 1965 “por su descubrimiento del control genético en los virus”, en concreto por sus estudios sobre la lisogenia (Lwoff and Gutmann, 1950; Lwoff *et al.*, 1950; Lwoff, 1953).

En relación con las bacterias, fue Joshua Lederberg quien, en colaboración con Tatum, demostró por vez primera el fenómeno de recombinación genética debido al proceso de *conjugación* (Lederberg and Tatum, 1946; Tatum and Lederberg, 1947). También contribuyó al esclarecimiento de la sexualidad en las bacterias como “donadoras” y “receptoras” (Lederberg *et al.*, 1952). Lederberg recibió el premio Nobel en 1958 “por sus descubrimientos relacionados con la recombinación genética y la organización del material genético en las bacterias”.

No se puede terminar este apartado sin recordar la importancia de la utilización del nematodo *Caenorhabditis elegans* para el estudio de la muerte celular programada y el control genético de la organogénesis (Brenner, premio Nobel 2002), la regulación de la expresión génica por interferencia del ARN (Fire y Mello, galardonados en 2006) y la utilización del gen *gfp* de la proteína fluorescente verde (Chalfie, premio Nobel en 2008) o las levaduras para el análisis del control del ciclo celular (Hartwell, Hunt y Nurse,

galardonados en 2001) y el análisis del mecanismo molecular de la transcripción (Kornberg, R.D., 2006).

4.3. La técnica

En este apartado nos referiremos a la tecnología de los ácidos nucleicos, por un lado, y a las técnicas de apoyo, por otro.

a) *Tecnología de los ácidos nucleicos*

1. *Restricción, hibridación, secuenciación y amplificación de ácidos nucleicos*

Como se ha indicado anteriormente, la etapa cronológica de la historia de la Genética que abarca de 1975 a 1985 se caracteriza por el desarrollo y aplicación de nuevas técnicas moleculares al análisis genético. Estas técnicas son la *restricción*, la *hibridación*, la *secuenciación* y la *amplificación* de los ácidos nucleicos que, en palabras del premio Nobel Daniel Nathans (1979), caracterizan la *Nueva Genética* (ver Lacadena, 1988b).

Por *restricción* se entiende la posibilidad de fragmentar el ADN por la acción de enzimas (*endonucleasas de restricción*) que reconocen secuencias específicas palindrómicas dentro del ADN y cortan la molécula por dichos puntos (Arber, 1974; Nathans and Smith, 1975). El grupo de Nathans (Danna *et al.*, 1973) fue uno de los pioneros en la construcción de *mapas de restricción* utilizando varias enzimas y separando los *fragmentos de restricción* por electroforesis en gel. Otra utilización práctica de las endonucleasas de restricción es el análisis del *polimorfismo para la longitud de los fragmentos de restricción* (RFLP). Werner Arber, Hamilton O. Smith y Daniel Nathans recibieron el premio Nobel en 1978 “por su descubrimiento de las endonucleasas de restricción y su aplicación en genética molecular”.

La *hibridación* de ácidos nucleicos quiere decir que, utilizando moléculas monocatenarias complementarias, se pueden construir moléculas bicatenarias híbridas ADN-ADN o ADN-ARN, pudiéndose realizar tal hibridación en sistemas *in vitro* o *in situ* sobre los cromosomas en las preparaciones citológicas.

La *secuenciación* de ácidos nucleicos significa la posibilidad de “leer” directamente la secuencia de bases contenidas en un fragmento de ADN. Frederick Sanger desarrolló en 1975 un método enzimático de secuenciación (*método “menos-más”, “minus-plus”,* Sanger and Coulson, 1975) que luego modificó en 1977 (*método didesoxi* o *de terminación de cadena*, Sanger *et al.*, 1977b). Mediante la secuenciación de diferentes

fragmentos de restricción y empalmando unas secuencias con otras, Sanger y colaboradores determinaron la secuencia completa de nucleótidos del cromosoma del fago ϕ X174 (5.375b, Sanger *et al.*, 1977a) y del ADN mitocondrial humano (16.569pb, Anderson *et al.*, 1981), permitiéndoles analizar su organización genética.

Por su parte, Walter Gilbert ideó en 1977 otro procedimiento de secuenciación basado, no en la síntesis enzimática, sino en la modificación química del ADN (Maxam and Gilbert, 1977). En 1980, Gilbert y Sanger recibieron el premio Nobel de Química “por sus contribuciones a la determinación de las secuencias de bases en los ácidos nucleicos”.

Las aplicaciones de las técnicas de secuenciación a la investigación genética son fabulosas. Por un lado, permiten “leer” la información genética de los genes, así como conocer la organización molecular del genoma de los organismos, desde los más simples, como el virus ϕ X174 antes mencionado, hasta los más complejos, como es el genoma humano.

De todos es conocida la importancia del denominado Proyecto Genoma Humano (3.000 millones de pares de bases) que se inició en 1988 y que se prevee finalizar en torno al año 2005. Algunas veces se utiliza la comparación de lo que supuso para la Medicina la obra de Andrés Vesalio (1515-1564) “*De fabrica humani corporis*” (1543) como fundamento de la Anatomía moderna con lo que el Proyecto Genoma Humano puede significar para la Medicina del futuro, la que algunos autores han bautizado como Medicina Predictiva y Medicina Genómica. Como decía el premio Nobel Watson (1990), decidido defensor del Proyecto Genoma Humano: “Nunca se encontrará un conjunto de libros de instrucción más importante. Cuando sean finalmente interpretados, los mensajes genéticos codificados dentro de nuestro ADN nos proporcionarán las últimas respuestas a los cimientos químicos de la existencia humana. No solamente nos ayudarán a comprender cómo funcionamos como seres humanos sanos, sino que también nos explicarán a nivel químico el papel de los factores genéticos en una multitud de enfermedades –como el cáncer, la enfermedad de Alzheimer y la esquizofrenia- que disminuyen la [calidad de] vida individual de millones de personas”. Las implicaciones éticas y legales del proyecto son importantes, pero no es éste el momento adecuado de abordarlas (ver Lacadena, 1993).

Por otro lado, una aplicación de la secuenciación del ADN es realizar el análisis genético en la dirección gen→proteína, contraria al análisis convencional. Es decir,

partiendo de la secuencia total o parcial de un gen se puede identificar mediante anticuerpos monoclonales (ver más adelante) dónde se sintetiza en el organismo la proteína para la que codifica el gen secuenciado. Es lo que se ha venido en denominar la *Genética Inversa* (Orkin, 1986) que, como se ha indicado anteriormente, forma parte substancial de la última etapa cronológica de la Genética que estamos viviendo actualmente.

Como he tenido oportunidad de decir en otras ocasiones (Lacadena, 1988b), en la actualidad puede decirse que los genes –los abstractos “factores hereditarios” de Mendel– se han hecho tangibles, ya se pueden “tocar”. Son fragmentos de ADN que se pueden identificar y aislar de entre toda la masa de ADN del genoma, que se pueden transferir de unas células a otras, de unos individuos a otros de la misma o de distinta especie. Por esta razón, cuando se habla de *manipulación genética* no hay que darle un sentido peyorativo al término manipulación, sino el de “operar con las manos o con cualquier instrumento” como define la Real Academia Española. La puesta a punto de las técnicas mencionadas ha proporcionado a la Genética Molecular una potencialidad enorme que es de esperar siempre sea utilizada para bien de la humanidad. Aquí podría recordar cómo hace treinta años, Fred Hoyle, astrónomo de la Universidad de Cambridge, profetizaba que “...los físicos, que sólo fabrican inofensivas bombas de hidrógeno, trabajarán en libertad, mientras que los biólogos moleculares lo harán tras alambradas eléctricas”. Salvando las distancias, podríamos hacer la siguiente comparación: lo mismo que el poder y el peligro de la Física se alcanzó cuando los científicos fueron capaces de “tocar” los átomos -me refiero a la Física Atómica y la energía nuclear-, el poder y el peligro potencial de la Genética se han hecho realidad cuando los científicos han podido “tocar” (manipular) los genes. Esperemos que el ADN -la doble hélice- no se convierta en una molécula de doble filo (Lacadena, 1990).

La *ingeniería genética molecular* surgió en la década de los setenta para manifestarse con un potencial fabuloso de aplicaciones en la década de los ochenta. Su fundamento científico está basado en la obtención de *moléculas de ADN recombinante*, entendiendo por tales la unión artificial -recombinación en concepto genético, de ahí su nombre- de fragmentos de ADN de procedencia distinta. En esencia, la ingeniería genética molecular consiste en la unión de un fragmento de ADN (un gen, por ejemplo) a otra molécula de ADN (puede ser el cromosoma de un virus o de un plasmidio) que, haciendo de vector, permitirá introducir dicho fragmento en células bacterianas o eucarióticas donde se multiplicará (clonación) y, en su caso, se expresará, sintetizando tales células los polipéptidos

codificados por los genes introducidos. Por ejemplo, un gen humano que se exprese en una célula bacteriana producirá la síntesis de la proteína humana en ésta.

La obtención de las moléculas recombinantes de ADN se realiza construyendo extremos monocatenarios complementarios (*extremos cohesivos*) en los fragmentos que se quiere unir. Paul Berg y colaboradores (Jackson *et al.*, 1972) utilizaron las enzimas nucleotidil terminal transferasas para fabricar los extremos cohesivos, que también se pueden generar mediante endonucleasas de restricción que producen roturas en bisel en las regiones de secuencias palindrómicas que reconocen. En 1980, Berg recibió el premio Nobel de Química (que compartió con Gilbert y Sanger) “por sus estudios fundamentales de bioquímica sobre ácidos nucleicos, en particular el ADN recombinante”.

Un factor limitante en algunas técnicas modernas de Genética Molecular -como son la secuenciación o la identificación del ADN por su polimorfismo para ciertas secuencias de nucleótidos repetidas en tándem (*ADN minisatélite o microsatélite*)- es la cantidad de ADN disponible. Tal sería el caso, por ejemplo, de una investigación de un crimen y sólo hubiera posibilidad de analizar una pequeña mancha de sangre, de esperma o de pelos. En 1985, Kary B. Mullis y colaboradores (Saiki *et al.*, 1985) inventaron la técnica de *reacción en cadena de la polimerasa*, abreviadamente conocida como PCR, que permite amplificar *in vitro* pequeños fragmentos de ADN, obteniendo millones de copias a partir de una única copia original por medio de la repetición de ciclos sucesivos de desnaturalización y síntesis del ADN. Para ello se utilizan oligonucleótidos como cebadores que sirven para iniciar cada nuevo proceso de síntesis en los extremos del fragmento que se quiere amplificar (Mullis *et al.*, 1986; Mullis and Faloona, 1987; Mullis, 1990). La automatización del proceso en un termociclador ha sido posible utilizando ADN polimerasas que no se desnaturalizan a las elevadas temperaturas en que se produce la desnaturalización. En este aspecto ha jugado un papel importante la ADN polimerasa de *Thermus aquaticus* (Innis *et al.*, 1988), que fue propuesta como “molécula del año” en 1989 por la revista *Science* (Guyer and Koshland, 1989).

La aplicabilidad de la PCR es tan grande que puede decirse que no hay hoy en día un laboratorio de Biología Molecular que no disponga de un termociclador. En 1993, Mullis recibió el premio Nobel de Química “por su invención del método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR)”. Kary B. Mullis es un premio Nobel atípico, tanto por no estar vinculado a ningún centro oficial de investigación como por su propia personalidad

humana. Incluso fue inusual la forma en la que gestó su idea de la reacción en cadena de la polimerasa en compañía de una muchacha a la luz de las estrellas, según él mismo ha narrado (Mullis, 1990).

Dentro de las técnicas innovadoras incluidas en la tecnología de los ácidos nucleicos que caracterizan la Nueva Genética hay que incluir también la de la *mutagénesis dirigida* basada en oligonucleótidos sintéticos puesta a punto por Michael Smith que, como ya se ha mencionado anteriormente, le permitió compartir el premio Nobel de Química 1993 con Mullis.

2. La tecnología knockout

En 2007, el premio Nobel en Fisiología o Medicina fue otorgado a la *tecnología knockout* materializada en tres científicos: Capecchi, Evans y Smithies. En el año 2001, la Fundación Lasker concedió el Premio Albert Lasker de Investigación Médica Básica a los mismos tres galardonados Nobel: Mario R. Capecchi, Martin J. Evans y Oliver Smithies, “por el desarrollo de una poderosa tecnología para manipular el genoma del ratón con exquisita precisión para la creación de modelos animales de enfermedades humanas”. Una vez más, los premios de la Fundación Lasker se han convertido en una antesala de los premios Nobel. La posibilidad de que estos científicos fueran galardonados con el premio Nobel se convirtió en una especie de profecía. Yo me puedo vanagloriar de que, desde ya hace unos cuantos años, venía repitiendo en mis clases y conferencias –y tengo numerosos testigos de ello– que la “técnica de modificación génica por recombinación homóloga” (*gene targeting*) y las “células troncales embrionarias” (*embryo stem cells*) iban a ser los temas elegidos por la Fundación Nobel como objeto de sus premios. Lo que sigue está tomado de Lacadena (2008).

Efectivamente, el 8 de octubre de 2007 la Asamblea Nobel del Instituto Karolinska hizo pública su decisión de otorgar el Premio Nobel de Fisiología o Medicina 2007 conjuntamente a Mario R. Capecchi, Martin J. Evans y Oliver Smithies por su descubrimiento de “los principios para introducir modificaciones génicas específicas en ratones mediante el uso de células troncales embrionarias”.

Como he señalado en ocasiones anteriores (Lacadena, 1995, 2006), la regla de oro de la investigación biológica, extensible obviamente a la investigación genética, se basa en los tres puntos siguientes: qué pregunta o problema se trata de resolver, en qué material

biológico y mediante qué técnica. No hay duda que si un investigador quiere llegar a premio Nobel habrá de plantearse una pregunta importante y, a partir de ahí, decidir cuál es el organismo más adecuado para abordar el problema y si dispone de la técnica metodológica o instrumental necesaria. Este año 2007, la Asamblea Nobel del Instituto Karolinska ha premiado en Capecchi, Evans y Smithies la técnica metodológica que permite “introducir modificaciones génicas específicas en ratones mediante el uso de células troncales embrionarias”. Como señalaba la nota de prensa de la Asamblea Nobel al anunciar el premio, la “modificación de genes por recombinación homóloga” puesta a punto por Capecchi y Smithies junto con la utilización de “células troncales embrionarias como vehículo para introducir material genético en la línea germinal de ratones” tal como investigó Evans dieron lugar a una poderosa tecnología conocida como “modificación génica específica en ratones” (*gene targeting in mice*) actualmente utilizada en casi todas las áreas de investigación en biomedicina, desde la investigación básica al desarrollo de nuevas terapias.

La modificación génica específica permite inactivar genes concretos del ratón, dejándoles “fuera de combate” o “noqueados” (*knock-out*). Ello ha permitido descubrir el papel de numerosos genes durante el desarrollo embrionario del ratón, la fisiología del estado adulto, el envejecimiento y la enfermedad. Hasta la fecha, se han llegado a noquear unos diez mil genes que equivalen aproximadamente a la mitad del genoma del ratón, esperándose que, en un esfuerzo de coordinación internacional, pronto se llegue a disponer de la colección completa de ratones *knock-out*. Mediante esta técnica se puede analizar el papel de los genes individuales en estados de salud o enfermedad, produciendo en el ratón modelos de enfermedades humanas; de hecho, como señalaba la Institución Karolinska, ya hay más de 500 modelos de enfermedades humanas en ratón tanto de enfermedades cardiovasculares como neurodegenerativas, diabetes o cáncer. Como dice Hansson (2007), miembro del Comité Nobel para Fisiología o Medicina, “entre las ciencias biomédicas básicas, es difícil imaginar la investigación médica contemporánea sin el uso de los modelos génicos modificados (*gene targeted models*)”. Evidentemente, la técnica es válida también para el planteamiento contrario; es decir, inactivar mutaciones concretas para recuperar el estado normal en el ratón: es el ratón “*knock-in*”.

Es interesante recordar que la inducción de mutaciones en la investigación genética había merecido ya el premio Nobel en dos ocasiones anteriores: la primera, en

1946 cuando Hermann J. Muller fue galardonado con el premio Nobel de Fisiología o Medicina “por su descubrimiento de la inducción de mutaciones mediante radiación con rayos X”; la segunda, en 1993 cuando Michael Smith obtuvo el premio Nobel de Química “por su contribución fundamental al establecimiento de la mutagénesis dirigida mediante oligonucleótidos y su desarrollo para estudios de proteínas”. La diferencia entre ambas aproximaciones a la mutagénesis inducida estriba, como claramente se ve, en que en el segundo caso la mutagénesis es dirigida al producir cambios específicos en la secuencia de bases del ADN manipulado. En la investigación de Capecchi, Smithies y Evans premiada en 2007, aunque no se trata realmente de inducir mutaciones, sin embargo, el resultado es equivalente al lograr sustituir por recombinación homóloga en un *locus* determinado un gen normal o un gen mutado (ratones *knock-out* o *knock-in*, respectivamente). Su investigación ha permitido modificar (sustituir) genes específicos en la línea germinal de mamíferos y producir descendencia que lleva y expresa el gen modificado: es la *tecnología knock-out* (Hansson, 2007).

La *tecnología knockout* en ratones tiene dos componentes principales: por un lado, el fenómeno de *recombinación homóloga* que permite sustituir un gen de un locus determinado por otra forma alélica y, por otro lado, la utilización de cultivos de *células troncales embrionarias* (ES) para modificar la línea germinal de los ratones. Ambos aspectos fueron desarrollados por Capecchi y Smithies y por Evans, respectivamente. A la hora de explicar en su conjunto cómo se desarrolló la *tecnología knockout* podría iniciarse la exposición empezando por las células troncales embrionarias para seguir con la recombinación homóloga o, por el contrario, empezar por la recombinación homóloga y seguir con las células troncales embrionarias para terminar, en cualquiera de los dos casos, en la unión de ambos componentes para llegar a obtener los *ratones knockout*. En mi exposición seguiré la segunda opción.

La historia empezó en 1982 cuando Capecchi y colaboradores demostraron que las células somáticas de ratón poseen una maquinaria enzimática que actúa de forma eficaz en la mediación de la recombinación homóloga (Folger *et al.*, 1982). Ante la posibilidad de utilizar esta maquinaria enzimática para inducir la recombinación homóloga entre una molécula de ADN introducida en la célula y la misma secuencia presente en el genoma de la célula receptora, Capecchi solicitó una subvención a los NIH para ensayar la factibilidad de su hipótesis (*gene targeting*) en células de mamífero. Sin embargo, su solicitud fue

rechazada porque los revisores del proyecto consideraron que era extremadamente improbable que el ADN introducido encontrara su secuencia homóloga dentro del genoma (citado con posterioridad por el propio Capecchi, 2001). Curiosamente, como señala Hansson (2007), casi simultáneamente Martin Evans solicitaba en Inglaterra al UK Medical Research Council subvención para un proyecto similar que también fue denegado por ser excesivamente ambicioso. Me pregunto si los correspondientes revisores no se habrán sonrojado por su desacierto, aunque sea en la intimidad. Hay que recordar que, en el anecdotario científico, estas situaciones han ocurrido muchas veces.

Afortunadamente, Capecchi no cejó en su empeño y obtuvo células mutantes susceptibles a la neomicina, siendo capaz de reparar tal deficiencia introduciendo el gen funcional normal *neo^r* con una alta frecuencia (1 por 1.000 células inyectadas), abriendo la posibilidad de que la recombinación homóloga pudiera ser utilizada para manipular genes del genoma de mamíferos (Thomas *et al.*, 1986).

Por su parte, también Oliver Smithies creía que podía utilizarse la recombinación homóloga para reparar genes mutados; es decir, una especie de “cirugía génica” que permite eliminar un gen defectuoso sustituyéndolo por otro sano. El primer paso lo dio Smithies ya en 1962 cuando propuso que una variante alélica del gen de la haptoglobina humana se había producido en la evolución por fenómenos de recombinación homóloga (Smithies *et al.*, 1962). Más tarde demostró que los genes G_γ y A_γ de la hemoglobina fetal humana se habían originado a través de mecanismos de recombinación homóloga (Slightorn *et al.*, 1980). Un paso adelante definitivo lo dio el grupo de Smithies al desarrollar un método que permitía recuperar por selección en el cultivo celular humano las células que habían sido genéticamente modificadas por recombinación homóloga de un plásmido en el gen de la β -globina (Smithies *et al.*, 1985).

La etapa siguiente hacia la nueva *tecnología knockout* surgió de la pregunta siguiente: ¿podría utilizarse la recombinación homóloga para modificar genes específicos en la línea germinal de manera que pudieran obtenerse animales genéticamente modificados? En otras palabras, ¿podrían utilizarse las células troncales embrionarias pluripotentes de ratón que Martin J. Evans había descubierto y cultivado unos años antes en colaboración con el embriólogo Matt Kaufman (Evans y Kaufman, 1981)? En su trabajo seminal Evans y Kaufman señalaban ya que el uso de las células troncales pluripotentes embrionarias (ES) como vehículo para transferir alelos mutantes al genoma del ratón

tendría grandes ventajas y tres años más tarde, en otro trabajo fundamental, Evans y colaboradores demostraron que la inyección de células troncales embrionarias en el blastocisto de ratón contribuían a la formación de células germinales funcionales y, por tanto, podían ser usadas para la obtención de ratones quiméricos (Bradley *et al.*, 1984). El siguiente paso consistió en probar que las células ES podían utilizarse para introducir material genético en la línea germinal (Robertson *et al.*, 1986). Un año más tarde, Evans y colaboradores (Kuehn *et al.*, 1987) introducían en células ES mediante infección con retrovirus el gen mutante para la hipoxantina fosforribosil transferasa (HPRT⁻) presente en el síndrome de Lesch-Nyhan, generando un ratón quimérico y en su descendencia ratones transgénicos portadores de la enfermedad. Como señala Hansson (2007), era el primer modelo animal de enfermedad humana creado por manipulación genética de células troncales embrionarias. Hay que señalar que, de forma simultánea, otro grupo de investigación obtenía también ratones deficientes para HPRT procedentes de una deleción espontánea producida en un cultivo de células ES (Hooper *et al.*, 1987).

Podría decirse que el paso efectivo a la *tecnología knockout* se dio cuando Evans y colaboradores en su publicación de 1987 antes mencionada (Kuehn *et al.*, 1987) dicen, citando las investigaciones de Capecchi (Thomas *et al.*, 1986) y de Smithies (Smithies *et al.*, 1985), que “puede ser eventualmente posible producir alteraciones específicas en genes endógenos por medio de recombinación homóloga con copias clonadas modificadas *in vitro*”. Efectivamente, ese mismo año 1987 el grupo de Smithies utilizaba por vez primera la recombinación homóloga para corregir (por sustitución homóloga) la mutación HPRT⁻ (que era una deleción) en un cultivo de células ES seleccionando las células en un medio HAT que requiere la actividad enzimática HPRT (Doetschman *et al.*, 1987). Asimismo, Thomas y Capecchi (1987) introdujeron el gen de la resistencia a neomicina en un exón del gen HPRT en células ES, demostrando que en el cultivo se podían seleccionar células que habían perdido la actividad HPRT pero ganado la actividad neo^r de resistencia a la neomicina, señalando que “esta combinación de usar células ES como línea celular receptora y la mutagénesis sede-específica obtenida por recombinación homóloga (*gene targeting*) proporcionará los medios para generar ratones de cualquier genotipo deseado”. Además, delineaban la estrategia a seguir en el futuro: “una ventaja de este escenario es que la primera generación quimérica será normalmente heterocigota para la mutación sustituida (*targeted*) y que la siguiente

generación puede ser utilizada para generar individuos homocigotos. Así, sólo tiene que ser inactivado uno de los dos loci, pudiendo mantenerse en heterocigosis los letales recesivos. Si esta estrategia tiene éxito, esta tecnología será utilizada en el futuro para diseccionar el proceso de desarrollo del ratón, así como para generar modelos de enfermedades humanas en el ratón”. Como señala Hansson (2007) en su informe avanzado en el que comenta la concesión del premio Nobel, “esta visión se ha hecho realidad y es ahora una piedra angular de la medicina experimental”.

Finalmente cabe añadir que al año siguiente Capecchi y colaboradores (Mansour *et al.*, 1988) mejoraban la técnica mediante la estrategia de una doble selección positiva-negativa. Para ello introdujeron un gen de resistencia a neomicina (neo^r) en un exón del vector de reemplazamiento que llevaba a su vez en un extremo y fuera del locus a sustituir en el proceso de recombinación homóloga el gen de la timidina quinasa (tk). Cuando se produce la recombinación homóloga se origina un cromosoma con el gen noqueado que expresará la información neo^r , pero no la tk que habrá desaparecido. Sin embargo, si el vector de reemplazamiento se integra al azar en cualquier lugar del genoma de la célula expresará tanto la resistencia a la neomicina como la actividad timidina quinasa y en caso de no integración del vector la célula sería susceptible a la neomicina. Por consiguiente, si las células sometidas a tratamiento crecen en presencia de neomicina y de la droga ganciclovir, solamente sobrevivirán las que lleven el cromosoma con el gen noqueado producido por la recombinación homóloga puesto que son resistentes a la neomicina (neo^r) y no les afecta la droga ganciclovir al no tener el gen tk (doble selección positiva-negativa).

Desde el punto de vista de la posible aplicación clínica de los descubrimientos comentados, hay que señalar que, además del síndrome de Lesch-Nyhan utilizado en las investigaciones iniciales ya mencionadas, el grupo de Smithies ha trabajado en modelos animales de algunas enfermedades como la fibrosis quística (Clarke *et al.*, 1992; Snouwaert *et al.*, 1992), la hipertensión y la aterosclerosis (Smithies y Maeda, 1995).

3. *La proteína fluorescente verde* (basado en Lacadena, 2009)

El 8 de octubre, la Real Academia Sueca de Ciencias comunicaba su decisión de otorgar el Premio Nobel en Química 2008 conjuntamente a los doctores Osamu Shimomura (Marine Biological Laboratory, Woods Hole, MA, y Boston University Medical School, USA), Martin Chalfie (Columbia University, New York, USA) y Roger Y. Tsien

(University of California, San Diego, La Jolla, USA) por “el descubrimiento y desarrollo de la proteína fluorescente verde, GFP”.

Como se ha mencionado anteriormente, la regla de oro de la investigación se sustenta en tres apoyos: la pregunta importante que se trata de responder, en qué material biológico y con qué técnicas se puede abordar la investigación. El premio Nobel concedido a Shimomura, Chalfie y Tsien se enmarca dentro de este último apartado: la proteína fluorescente verde (GFP, *green fluorescent protein*) ha resultado ser una herramienta poderosísima en la investigación genética. Como decía la nota de prensa de la Real Academia Sueca de Ciencias, la GFP descrita por vez primera en 1962 por el Dr. Shimomura (Shimomura et al., 1962) en la medusa *Aequorea victoria* ha llegado a ser uno de los instrumentos más importantes de la investigación en biociencia actual porque “permite el análisis a nivel molecular de los procesos espacio-temporales intra- e intercelulares que definen el comportamiento dinámico de todos los sistemas vivientes” (Ehrenberg, 2008). Aunque el trabajo inicial de Shimomura estaba enfocado hacia la proteína responsable de la bioluminiscencia de la medusa que denominó *aequorina*, sin embargo, mencionaban también en su trabajo que habían aislado otra proteína que era ligeramente verdosa a la luz del sol, amarillenta bajo luz incandescente y verde fluorescente bajo luz ultravioleta. En un principio la llamaron “proteína verde” a secas; la denominación de “proteína fluorescente verde” fue posterior. Más adelante, Shimomura demostró que la GFP –que es una proteína de 238 aminoácidos– contiene un cromóforo especial que al ser excitado por la luz azul o la luz ultravioleta emite luz en la longitud de onda verde. Esto explica que en la medusa *Aequora victoria* el cromóforo de la GFP simplemente transforma la luz azul de la proteína *aequorina* en luz verde. Pero lo más importante del caso es que, a diferencia del comportamiento de la *aequorina* y otras proteínas bioluminiscentes que necesitan el suministro continuo de moléculas ricas en energía, a la GFP le basta con la luz UV o la luz azul para fluorescer. Cuando la luz entra en las células y encuentra a la GFP se produce la fluorescencia verde sin necesidad de tener que introducir en la célula producto químico alguno que pudiera disturbar los procesos que ocurren en su interior. Shimomura (1979) clarificó la estructura química del cromóforo de la GFP que está formado por los aminoácidos de las posiciones 65, 66 y 67 (Ser-Tyr-Gly) que reaccionan químicamente entre sí para formar el cromóforo

fluorescente que resulta ser la p-hidroxibenciliden-imidazolinona que tiene su máximo de excitación a 400nm y el máximo de emisión a los 505 nm.

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

Fue en 1988 cuando Chalfie oyó hablar por vez primera de la GFP en un seminario sobre organismos bioluminescentes que tuvo lugar en la Columbia University, cayendo en la cuenta de que la GFP podía ser de gran utilidad en sus estudios con el nematodo *Caenorhabditis elegans* que había iniciado en su estancia postdoctoral en el laboratorio de Sydney Brenner, premio Nobel en Fisiología o Medicina 2002.

La idea de Chalfie era conectar el gen de la GFP con genes reguladores o con genes que codifican para otras proteínas. Para ello utilizó el gen *gfp* aislado en 1992 por Prasher y colaboradores (1992) y al clonarlo en *Escherichia coli* le permitió demostrar que la GFP no necesitaba de otras proteínas para producir el cromóforo.

Posteriormente, Chalfie y colaboradores (1993, 1994) lograron unir el gen de la GFP al promotor de un gen que es activo en seis neuronas de receptores de contacto de *C. elegans*. Lo importante es que, cuando el gen de la GFP se une al de otra proteína que se quiere estudiar en algún organismo, dicha proteína no pierde su actividad normal a la vez que la GFP mantiene su fluorescencia, de manera que se puede seguir la localización, movimiento e interacciones de la proteína dentro del organismo mediante monitorización con el microscopio.

A partir de aquí es cuando entra en escena el Dr. Tsien cuyo mérito indudable ha sido el de ampliar la “paleta de colores” disponible para el investigador mejorando,

además, la intensidad y duración de su brillo. Tsien y colaboradores (Heim et al., 1994) estudiaron cómo la formación del cromóforo fluorescente en la GFP ocurre postraduccionalmente con el oxígeno molecular como único factor auxiliar.

Asimismo, manipulando el ADN del gen GFP, el grupo de Tsien obtuvo nuevas variantes de GFP que aumentaban la intensidad del brillo y producían la aparición de nuevos colores (azul, amarillo, etc.) (Heim et al., 1995; Heim y Tsien, 1996; Tsien, 1998), destacando también sus importantes contribuciones para lograr el desarrollo de variantes de las proteínas fluorescentes rojas a partir de la “proteína fluorescente DsRed” procedente del coral *Discosoma* (Gross et al., 2000). Para revisiones sobre el trabajo de Tsien y colaboradores ver Shaner et al. (2004, 2007, 2008). Como decía un comentarista de la institución Nobel, “46 años después de que Shimamura publicara su trabajo sobre la GFP, hay un caleidoscopio de proteínas “GFP-like” que brillan con todos los colores del arco iris”.

Como señalaba la nota de prensa de la Real Academia Sueca de Ciencias, “los investigadores pueden analizar el daño de las células nerviosas en la enfermedad de Alzheimer o cómo se originan las células beta productoras de insulina en el páncreas durante el desarrollo del embrión o las células nerviosas del cerebro”. Aplicaciones espectaculares de estas técnicas son, por ejemplo, el denominado “cerebro-arco iris” (*brainbow*) de ratones genéticamente modificados que producen distintas coloraciones (amarillo, azul oscuro y rojo) en las células nerviosas del cerebro, lo cual permite seguir la pista de las fibras nerviosas desde células individuales en la intrincada red cerebral.

Por mi afición a relacionar los dichos y los refranes con la Genética (Lacadena, 2003 b), permítaseme en este contexto académico hacer referencia al conocido dicho “dígaselo con flores” que puede ser parafraseado por el de “dígaselo con genes”, teniendo en cuenta la aplicación de las técnicas de ingeniería genética molecular que permiten modificar los colores naturales de las flores (por ejemplo, la obtención de rosas azules) o cuando se utiliza la expresión “es más raro que un perro verde” que hoy, con la manipulación genética del gen de la proteína fluorescente verde no nos causaría extrañeza si recordamos que ya estamos acostumbrados a ver “ratones verdes” en el laboratorio. Además, al tener en cuenta cómo la GFP hace visibles a las proteínas a las que se une tras la manipulación genética, me viene a la memoria el dicho “dime con quién andas y te diré quién eres”.

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

b) *Técnicas de apoyo*

Además de las técnicas directamente relacionadas con la tecnología de los ácidos nucleicos, puede ser interesante hacer referencia a otras que podríamos llamar “técnicas de apoyo” que también fueron merecedoras del galardón Nobel.

1. *Anticuerpos monoclonales*

La técnica de la obtención de los *anticuerpos monoclonales* mediante *hibridomas* fue puesta a punto por César Milstein y George J. F. Köhler mediada la década de los setenta (Köhler and Milstein, 1975, 1976; Milstein, 1980; Milstein and Cuello, 1983).

Los *hibridomas* son células híbridas de linfocitos y células de mieloma capaces de mantener, por un lado, la propiedad de inmortalidad de la célula cancerosa y, por otro lado, la de sintetizar un tipo concreto de anticuerpo. Es decir, cada clon celular híbrido es una fuente de producción a largo plazo de cantidades substanciales de un solo anticuerpo altamente específico: el anticuerpo monoclonal.

Dentro de la inmunogenética, la producción de anticuerpos monoclonales se ha convertido en una herramienta de trabajo indispensable en la investigación biomédica actual. En 1984, Köhler y Milstein recibieron el premio Nobel “por sus descubrimientos del principio que rige la producción de anticuerpos monoclonales”.

2. *Fecundación in vitro*

La técnica de fecundación *in vitro* desarrollada por Robert G. Edwards en la década de 1970 puede considerarse como técnica de apoyo en el ámbito de la historia de la Genética si se tiene en cuenta que la obtención de embriones humanos para la obtención de células troncales pluripotentes embrionarias es una de las áreas de la Medicina Regenerativa. En un apartado posterior será tratado más ampliamente el tema.

c) *Técnicas auxiliares*

Aunque no se trata de investigaciones en el campo de la Genética, no sería lógico terminar este apartado sin mencionar la invención de la ultracentrífuga de Svedberg, la técnica de electroforesis de Tiselius, el microscopio electrónico de Ruska, el microscopio electrónico de barrido (*scanner*) de Binning y Rohver, el microscopio de fluorescencia fundamento de la *nanoscopía* de Berzig, Hell y Moerner de tanta utilidad en la investigación moderna, que recibieron los respectivos premios Nobel en 1926, 1948, 1986 y 2014.

5. ÁREAS ESPECÍFICAS DE INVESTIGACIÓN EN GENÉTICA Y LOS PREMIOS NOBEL

El análisis del desarrollo histórico-conceptual de la Genética desde el punto de vista de los premios Nobel concedidos pone de manifiesto que -además de las investigaciones realizadas para dar contestación a las preguntas referentes al concepto de Genética como ciencia que estudia el material hereditario: ¿qué son los genes? ¿cómo se organizan y transmiten? ¿cómo y cuándo se expresan? ¿cómo cambian? - hay algunas áreas específicas que también han sido motivo de concesión del galardón, tales como la Inmunogenética, la Genética y el Cáncer y la Genética aplicada a la Mejora de Plantas (ver el Cuadro 5).

CUADRO 5. ÁREAS DE INVESTIGACIÓN Y LOS PREMIOS NOBEL

<ul style="list-style-type: none">▪ El material hereditario: Los genes:<ul style="list-style-type: none">• qué son• cómo se organizan y transmiten• cómo y cuándo se expresan• cómo cambian• cuál es su destino en el espacio y en el tiempo<p style="text-align: center;"><i>(ver cuadros anteriores)</i></p>▪ Inmunogenética<ul style="list-style-type: none">• Inmunología de los grupos sanguíneos humanos (1900, 1901): Landsteiner (1930)• Tolerancia inmunológica y teoría de la selección clonal (1959): Medawar y Burnet (1960)• Estructura química de los anticuerpos (1969): Porter y Edelman (1972)• Sistemas de histoincompatibilidad (1948, 1958): Snell, Benacerraf y Dausset (1980)• Control de sistemas de inmunidad: Jerne (1984)• Anticuerpos monoclonales (1975): Köhler y Milstein (1984)• Base genética de la diversidad de los anticuerpos (1976): Tonegawa (1987)• Especificidad de la respuesta inmune mediatizada por células (1973, 1975): Doherty y Zinkernagel (1996)• El virus de inmunodeficiencia humana, HIV (1983): Barré-Sinoussi y Montagnier (2008)• Activación de la inmunidad innata (1996, 1998): Hoffmann y Beutler (2011)• Células dendríticas y su papel en la activación de la inmunidad adaptativa (1973, 1978): Steinman (2011)▪ Genética y cáncer<ul style="list-style-type: none">• Interacción entre los virus tumorales y el material genético de las células (1964, 1970): Dulbecco, Baltimore y Temin (1975)• Origen celular de los oncogenes retrovirales (1976): Bishop y Varmus (1989)

- Control genético del ciclo celular (1970, 1981) y las ciclinas (1983): Hartwell, Hunt y Nurse (2001)
- Virus del papiloma humano y cáncer cervical (1983): zur Hausen (2008)
- Papel de la telomerasa en el envejecimiento y el cáncer (1997): Greider (2009)
- Genética del desarrollo
 - Regulación de la expresión génica. Modelo del operón (1961): Jacob y Monod (1965)
 - Regulación de la expresión génica por ARN de interferencia (1998): Fire y Mello (2006)
 - El efecto organizador en el desarrollo embrionario de anfibios: Spemann (1935)
 - Control genético del desarrollo embrionario temprano en *Drosophila* (1978, 1980): Lewis, Nüsslein-Volhard y Wieschaus (1995)
 - Control genético de la organogénesis y de la muerte celular programada en *Caenorhabditis elegans* (1974, 1977, 1986): Brenner, Horvitz y Sulston (2002)
 - Tecnología *knock-out* (1981, 1986, 1987): Capecchi, Evans y Smithies (2007)
 - Fecundación in vitro (1970, 1971, 1978): Edwards (2010)
 - Reprogramación celular: clonación y células troncales pluripotentes inducidas (1962, 2006): Gurdon y Yamanaka (2012)
 - Transporte de vesículas en las células (1979, 1984): Rothman, Scheckman y Südhof (2013)
 - Autofagia (1992,1993): Ohsumi (2016)
 - Comportamiento:
 - Control genético y organización del sistema olfativo (1991): Axel y Buck (2004)
 - Organización y elaboración de patrones de comportamiento individual y social: von Frisch, Lorenz y Tinbergen (1973)
- Genética aplicada a la mejora de plantas
La revolución verde: Borlaug (1970)

(Las fechas que se citan en primer lugar corresponden a las de los trabajos originales fundamentales mientras que las que aparecen detrás de los nombres de los investigadores hacen referencia a las de concesión del premio Nobel correspondiente)

5.1. El material hereditario

Las investigaciones que tienen como objeto el material hereditario –los genes– han sido tratadas en lugares anteriores.

5.2. Inmunogenética

El contenido del presente apartado está basado en Lacadena (1988a y 2009).

Resulta llamativo que en once ocasiones se haya concedido el premio Nobel a investigaciones realizadas en el campo de la Inmunogenética.

Las primeras investigaciones del campo de la Inmunología que fueron relacionadas más tarde con la Genética fueron las de los grupos sanguíneos humanos del sistema ABO realizadas por Karl Landsteiner en 1900 y 1901 que le condujeron a clasificar las personas como pertenecientes a una de cuatro clases (fenotipos) posibles según se produjera o no aglutinación al mezclar suspensiones de eritrocitos de un tipo con suero sanguíneo de otro tipo (pruebas cruzadas de aglutinación). A tales clases las denominó A, B, AB y 0. La aglutinación es debida a la reacción de sustancias antigénicas específicas presentes en la superficie de los glóbulos rojos con anticuerpos específicos presentes en el suero sanguíneo. Cuando Landsteiner realizó estos estudios se acababan de redescubrir las leyes de Mendel y él no aportó la explicación genética. El determinismo genético (una serie alélica) fue establecido veinticinco años más tarde por Bernstein. Landsteiner que también descubrió los sistemas M,N (Landsteiner and Levine, 1927) y Rh (Landsteiner and Wiener, 1940), recibió el premio Nobel en 1930 “por sus descubrimientos de los grupos sanguíneos de la especie humana”.

Los mecanismos de defensa de los organismos sirven para inactivar o eliminar elementos extraños por medios tales como la fagocitosis, la encapsulación o la producción de sustancias solubles. Sin embargo, junto a estos mecanismos filogenéticamente antiguos, los vertebrados han desarrollado un *sistema inmune* extraordinariamente específico basado a nivel molecular en la producción de *anticuerpos* o *inmunoglobulinas* y a nivel celular en el concurso de *elementos linfoides*. Esta dicotomía funcional -inmunidad humoral *versus* inmunidad celular- se refleja a nivel citológico en la existencia de dos poblaciones de células linfoides: las células B y las células T.

La *respuesta inmune* dentro de los vertebrados superiores puede consistir en una *respuesta humoral* -en la que se producen anticuerpos circulantes con especificidad hacia el antígeno que ha inducido su producción- y en una *respuesta celular* en la que los efectores son las propias células linfoides. A nivel citológico, la respuesta humoral está directamente relacionada con la diferenciación de células B en *células plasmáticas* con capacidad para secretar anticuerpos específicos.

Frente al ataque de microorganismos patógenos (virus, bacterias, hongos, protozoos) el organismo presenta dos líneas de defensa: la primera -la *inmunidad innata*- puede destruir a los organismos invasores y desencadenar una inflamación que contribuye a detener el ataque externo; sin embargo, si los microorganismos atacantes

salvan esta primera barrea defensiva es cuando entra en acción la segunda línea de defensa –la *inmunidad adaptativa*– con la actividad de las células T que destruyen las células infectadas. Así como la inmunidad innata “no tiene memoria”, el sistema inmune adaptativo mantiene una memoria inmunológica que actúa rápidamente en caso de que el organismo vuelva a ser atacado por el mismo agente patógeno.

Como señalaba el comunicado de prensa de la Asamblea Nobel del Instituto Karolinska, aunque durante el pasado siglo se habían identificado los componentes del sistema inmune mediante investigaciones que habían sido galardonadas en su momento con el premio Nobel, sin embargo fueron las investigaciones de Beutler, Hoffmann y Steinman galardonadas en 2011 las que permitieron conocer los mecanismos que activan la inmunidad innata y establecen la comunicación entre la inmunidad innata y la adaptativa.

a) Inmunidad innata

En mi opinión, podría decirse que el descubrimiento de los sensores de la inmunidad innata tuvo algo de azar. En efecto, Jules A. Hoffmann y colaboradores (Lemaitre *et al.*, 1996), que investigaban cómo la mosca *Drosophila* combatía las infecciones de bacterias y hongos, utilizaron distintas cepas observando que los mutantes para el gen *Toll* descubierto por Christiane Nüsslein-Volhard morían por ataque de los microorganismos, concluyendo que el producto del gen *Toll* estaba implicado en la detección de los organismos patógenos, siendo necesaria su activación para lograr una defensa eficaz frente al ataque externo. Nüsslein-Volhard –que compartió con Erick F. Wieschaus y Edward B. Lewis en 1995 el Premio Nobel “por sus descubrimientos sobre el control genético del desarrollo temprano del embrión”– descubrió en 1985 el gen *Toll* como responsable del desarrollo embrionario, controlando la polaridad dorsal-ventral del embrión (Anderson *et al.*, 1985 a, 1985 b) y comportándose como un gen de efecto materno; es decir, es un caso de efecto del genotipo materno vía citoplasma a través del ARN mensajero (Anderson y Nüsslein-Volhard, 1984).

Por otro lado, Bruce A. Beutler trataba de encontrar un receptor capaz de unirse al lipopolisacárido (LPS) bacteriano que puede producir un choque séptico que lleva aparejada la sobreestimulación del sistema inmune. En 1998, Beutler y colaboradores (Poltorak *et al.*, 1998) encontraron que ratones resistentes a LPS eran mutantes para un gen análogo al gen *Toll* de *Drosophila*, demostrándose que este receptor análogo a *Toll*

(TLR, por *Toll-like receptor*) era el buscado receptor para LPS. Cuando TLR se une a LPS se activan las señales que producen inflamación, pero si las dosis de LPS son excesivas se produce el choque séptico.

Ambos tipos de investigaciones llevaron a la conclusión de que tanto un insecto (la mosca del vinagre, *Drosophila*) como un mamífero (el ratón) utilizan moléculas similares para activar la inmunidad innata frente a microorganismos patógenos. Hoy día se han identificado en ratón y en humanos una docena de receptores TLR diferentes. Individuos mutantes para algunos de los genes correspondientes resultan ser más susceptibles a infecciones mientras que otras variantes genéticas pueden aumentar el riesgo de padecer enfermedades inflamatorias crónicas.

b) Inmunidad adaptativa

El nexo de unión entre la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa se descubrió gracias a las investigaciones de Ralph M. Steinman y colaboradores a partir de su descubrimiento en 1973 de las células dendríticas en órganos linfoides periféricos del ratón (Steinman y Cohn, 1973) y la demostración de que tienen la capacidad única de activar las células T (Steinman y Witmer, 1978) y que juegan un papel clave en la inmunidad adaptativa. Posteriormente se demostró que señales procedentes de la respuesta de inmunidad innata son reconocidas por las células dendríticas, controlando la activación de las células T (Schuler y Steinman, 1985).

En el caso del Dr. Steinman produjeron dos circunstancias especiales:

- La primera circunstancia es que falleció el 30 de septiembre de 2011, tres días antes de que se hiciera público que se le había concedido el Premio Nobel, creándose una situación un tanto complicada porque los estatutos de la Institución Nobel exigen que la persona galardonada esté viva aunque se mantendría el premio si el galardonado falleciera en el lapso de tiempo que media entre cuando se hace pública la concesión y la ceremonia oficial de entrega de los premios el 10 de diciembre de cada año. Por tanto, habría un problema si realmente la deliberación final de la Asamblea Nobel formada por 50 profesores del Instituto Karolinska tuvo lugar el 3 de octubre como parece deducirse de la nota oficial pública. Otra solución podría darse si realmente el Comité Nobel, formado por 5 miembros más el secretario que evalúa las nominaciones, hubiera decidido hacer la propuesta del Premio Nobel antes del 30 de septiembre cuando el Dr. Steinman aún

estaba vivo. No obstante, finalmente, el Comité Nobel decidió mantener el premio a título póstumo. Según recoge algún periódico (M. Ramírez, *Crónica, El Mundo*, 9/10/2011), Steinman luchaba por alargar su vida porque tenía la esperanza de ser galardonado con el Premio Nobel y le decía a su hija Alexis que “tengo que aguantar hasta el lunes. Si me muero, no os van a dar el Nobel a vosotros”. Dice su viuda, Claudia, que sólo le había comunicado su fallecimiento a dos personas de la Universidad de manera que la mayoría de su equipo celebró al amanecer del lunes 3 de octubre la concesión del Premio Nobel y media hora más tarde les llegó el duelo con la noticia de que había fallecido el viernes anterior 30 de septiembre.

Aunque en los medios de comunicación se ha extendido la idea de que Steinman ha sido el primer caso excepcional de premio Nobel póstumo, en realidad no es así porque en 1961 se le concedió el Premio Nobel de la Paz a título póstumo a Dag Hammarskjöld, Secretario General de Naciones Unidas, que había fallecido el 18 de septiembre de 1961 en un accidente de aviación en África.

- La segunda circunstancia se refiere al hecho de que, estando padeciendo un cáncer de páncreas desde hacía cuatro años, el Dr. Steinman se sometió a una nueva terapia diseñada por él mismo con sus propias células dendríticas en coherencia con sus investigaciones. Algo así como si fuera su propia cobaya humana. En este contexto se puede mencionar también que el premio Nobel Barry J. Marshall, galardonado en 1995 “por su descubrimiento de la bacteria *Helicobacter pylori* y su papel en la gastritis y en la úlcera péptica”, se autoinoculó con la bacteria para confirmar su hipótesis de trabajo, haciendo también de cobaya humana.

Como señalaba la nota de prensa de la Asamblea Nobel del Instituto Karolinska, los descubrimientos básicos galardonados con el Premio Nobel en Fisiología o Medicina 2011 han permitido desarrollar en Medicina nuevos métodos para la obtención de vacunas contra infecciones o intentar estimular el sistema inmune para atacar tumores, así como avanzar en el conocimiento de las enfermedades autoinmunes.

La Inmunogenética ha planteado a lo largo del tiempo una serie de interrogantes como son los fenómenos de memoria y tolerancia inmunológica, la estructura y origen de la diversidad de los anticuerpos, los sistemas de histocompatibilidad, etc. Las investigaciones en torno a dichas cuestiones han dado lugar a la concesión de diversos premios Nobel en 1960, 1972, 1980, 1984 y 1987. Así, Peter Medawar y Frank Macfarlane

Burnet lo recibieron en 1960 “por su descubrimiento de la tolerancia inmunológica adquirida” y a Rodney R. Porter y Gerald M. Edelman se les concedió el de Química en 1972 “por sus descubrimientos sobre la estructura química de los anticuerpos (Porter, 1959, Edelman, 1959; Edelman *et al.*, 1969).

El concepto de *gen principal de histocompatibilidad* fue introducido por Snell y colaboradores (Snell, 1948, 1953; Snell *et al.*, 1953) para establecer la distinción entre el gen o genes asociados con el rechazo agudo de injertos y tumores alogénicos de los *genes menores de histocompatibilidad* que controlan el rechazo crónico de injertos de tejidos alogénicos normales y no producen normalmente el rechazo de injertos de tumores. Posteriormente se supo que los genes principales están agrupados formando un nicho de loci (*cluster*) sobre un cromosoma, constituyendo el *complejo o sistema principal de histocompatibilidad* (MHC o MHS) que ha resultado ser el sistema genético más polimórfico y multialélico conocido en los mamíferos. También Snell (1948, 1953) desarrolló el concepto, e inició la producción, de líneas *congénicas* o *isogénicas* de ratón cuyo análisis le permitió establecer las bases genéticas y biológicas de la histocompatibilidad en general y de la estructura genética del sistema principal de histocompatibilidad (MHS) en particular (el sistema *H-2* del ratón), así como su importancia en la biología de los trasplantes, la respuesta inmune, la diferenciación de células inmunes, etc.

Más tarde, Jean Dausset (1958) describió el antígeno humano *MAC* -hoy denominado *HLA-A2*- basándose en el modelo de reacción de los anticuerpos leucocito-aglutinantes encontrados en sueros de determinadas personas. A partir de entonces se desarrollaron las investigaciones que llevaron a describir el sistema *HLA* humano como análogo del sistema *H-2* del ratón (Dausset *et al.*, 1965, 1968, 1969).

Otra aportación importante fue la realizada por Baruj Benacerraf y colaboradores quienes descubrieron la existencia de los genes responsables de la respuesta inmune (genes *Ir*); es decir, que la capacidad de un organismo para producir la respuesta inmune ante la presencia de un antígeno está controlada genéticamente. También demostraron que los genes *Ir* están situados en el complejo principal de histocompatibilidad (McDevitt and Benacerraf, 1969; Benacerraf and McDevitt, 1972).

La importancia de las investigaciones de Snell, Dausset y Benacerraf fue reconocida por el Instituto Karolinska cuando les concedió el premio Nobel en 1980 “por sus

descubrimientos sobre las estructuras de las superficies celulares genéticamente determinadas que rigen las reacciones inmunológicas”.

En 1984, Niels K. Jerne recibió el premio Nobel “por sus teorías sobre la especificidad en el desarrollo y control de los sistemas de inmunidad”. Frente a las teorías “instruccionistas” vigentes en la época, que sugerían que el antígeno servía de molde para la formación del anticuerpo, Jerne propuso una teoría selectiva revolucionaria; es decir, la información que generan las moléculas de anticuerpo con especificidades diferentes está presente en el huésped antes de que encuentre al antígeno. Era un concepto darwiniano -la variación preexistente y la selección conducen a alteraciones en la estructura de las poblaciones- que plasmó el ya mencionado premio Nobel Burnet (1959) en la “teoría de la selección clonal” (ver Edelman, 1994).

Junto con Jerne compartieron el premio Nobel en 1984 George J. F. Köhler y César Milstein “por su descubrimiento del principio que rige la producción de anticuerpos monoclonales” que se ha comentado en un lugar anterior. Es posible que los experimentos de Köhler y Milstein no se hubieran producido sin la influencia de las ideas de Jerne.

Uno de los problemas esenciales en la inmunología es el de explicar los *mecanismos genéticos* por los que se produce la enorme *diversidad de anticuerpos*. ¿Cómo es posible que un único genotipo pueda codificar para anticuerpos específicos para un número ilimitado de antígenos? Partiendo del conocimiento de que las *proteínas Bence-Jones* -secretadas en la orina por pacientes con mieloma múltiple (cáncer de células plasmáticas) y que corresponden a cadenas ligeras de inmunoglobulinas- tienen la mitad de su mapa peptídico común en todos los individuos y la otra mitad diferente, Dreyer y Bennet (1965) propusieron que tanto las cadenas ligeras como las pesadas de los anticuerpos podían ser el producto de dos genes distintos (V =variable y C =constante). Es decir, proponían la hipótesis *dos genes-un polipéptido*, contraria a cualquier planteamiento anterior. La hipótesis fue confirmada experimentalmente por Susumu Tonegawa y colaboradores mediante mapas físicos de restricción (Hozumi and Tonegawa, 1976) y mediante clonado y secuenciación (Bernard *et al.*, 1978). En efecto, Hozumi y Tonegawa (1976) demostraron que los *genes funcionales* de anticuerpos son ensamblados o construidos en los linfocitos B mediante sucesos de *reordenación* que mueven segmentos de ADN que codifican para *regiones variables*, aproximándolas a segmentos de ADN que codifican para *regiones constantes*; es decir, establecieron la base genética de la diversidad de los anticuerpos

(Tonegawa *et al.*, 1977; Tonegawa, 1983). En 1987 recibía Tonegawa el premio Nobel “por su descubrimiento del fundamento genético de la formación de una rica variedad de anticuerpos”.

Una característica fundamental del fenómeno inmune es la capacidad del organismo para reconocer cuándo una macromolécula o cualquier posible antígeno es propio o extraño, de forma que sólo en este último caso pondrá en funcionamiento los mecanismos precisos para desarrollar una respuesta inmune. No hay duda que, de alguna forma, los sistemas inmunológicos aprenden a reconocer sus propias moléculas en un proceso de aprendizaje que tiene lugar durante las primeras etapas de la vida, obviamente antes de que se desarrolle la respuesta inmune para las proteínas o antígenos extraños. Se llama *tolerancia inmunológica* a la falta de respuesta inmune frente a cualquier antígeno presente ya en el organismo cuando éste inicia el desarrollo del sistema generador de anticuerpos o de células T; es decir, la tolerancia inmunológica es la capacidad de reconocer “lo propio” y no responder inmunológicamente. Como hemos mencionado anteriormente, los premios Nobel Peter B. Medawar y Frank Macfarlane Burnet estudiaron el fenómeno de la tolerancia inmunológica.

Una diferencia importante entre los linfocitos B y T es que los primeros se activan con la sola presencia del antígeno que les es específico, mientras que los linfocitos T sólo se activan si el antígeno está expuesto en la superficie de una célula que lleve además las “señas de identidad” del propio individuo. Tales “señas de identidad” están determinadas por su sistema principal de histocompatibilidad (MHC) codificado, en el caso humano, por el conjunto de genes que constituyen el denominado sistema HL-A y que está localizado en el cromosoma 6. Dentro del sistema HL-A son especialmente importantes los genes de la clase I y de la clase II.

Las *células T citotóxicas* responden al antígeno específico y a la presencia simultánea de una proteína MHC de la clase I, mientras que las *células T ayudantes* responden al antígeno específico y a la presencia simultánea de una proteína MHC de la clase II. La necesidad de las células T de reconocer las “señas de identidad” del propio sistema MHC se denomina *fenómeno de restricción MHC*. El proceso por el cual las células T adquieren durante su paso por el timo la propiedad de reconocer los antígenos sólo en presencia de las proteínas MHC del propio individuo se conoce con el nombre de *educación o maduración tímica*.

Por *mismidad genética* se entiende la condición genética de ser uno mismo o por la cual se es uno mismo. Es equivalente a *identidad genética*, concepto relacionado con la capacidad genética del organismo de distinguir lo “propio” de lo “extraño”. De lo dicho anteriormente se desprende que el concepto de identidad o mismidad genética depende, por lo tanto, de las proteínas de las clases I y II codificadas por los respectivos genes del sistema principal de histocompatibilidad (MHC). En otras palabras, el “documento de identidad” o las “señas de identidad” genéticas de un individuo están escritos en los genes de su sistema HLA. Ello justificaría, tal como se ha indicado antes, su elevado polimorfismo.

Todo lo dicho nos lleva a plantear la cuestión de cuándo en el desarrollo del individuo se actualiza su identidad o mismidad genética. Es decir, aunque el genotipo del cigoto incluye ya, obviamente, el sistema HLA con un haplotipo (genotipo) determinado, sin embargo, su actualización no se hace efectiva hasta que los genes que contiene se expresen (transcripción) y se sinteticen (traducción) las proteínas correspondientes. En ese momento podría decirse que quedan fijadas las “señas de identidad” del individuo. Estas cuestiones pueden tener trascendencia cuando se discuten las consideraciones genético-biológicas sobre el desarrollo embrionario humano y la individualidad del nuevo ser humano (Lacadena, 1995c). No cabe duda que el título de la Conferencia Nobel de Burnet en 1960 -“Immunological recognition of self”- resulta premonitorio. Para una biografía de Sir Frank Macfarlane Burnet ver Sexton (1992).

En el contexto de la inmunogenética fue de enorme importancia el descubrimiento en 1983 del virus de la inmunodeficiencia humana VIH (HIV, si se utiliza el acrónimo inglés) por parte de Françoise Barré-Sinoussi y Luc Montagnier, solamente dos años después de que se hubieran disparado todas las alarmas ante la pandemia del síndrome de la inmunodeficiencia adquirida conocido como SIDA (AIDS, si se utiliza el acrónimo inglés); descubrimiento que les valió el Premio Nobel en Fisiología o Medicina 2008. Con tal motivo, me referí a los avatares de la controversia del descubrimiento con el siguiente título “El virus de inmunodeficiencia humana: deshaciendo el nudo gordiano” (Lacadena, 2009) que me permito incluir a continuación:

Hace unos años escribía yo un comentario sobre los “Fraudes científicos: Ética de la investigación” en el que recogía las siguientes palabras (Lacadena, 2006):

“En la década de los ochenta del siglo pasado, fue muy notable la controversia establecida entre el Dr. Robert Gallo, del Instituto Nacional del Cáncer en Bethesda, USA, y el Dr. Luc

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

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

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

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

descubrimiento la Asamblea Nobel del Instituto Karolinska dice muy claramente que en 1983 Barré-Sinoussi y Montagnier concluyeron que habían descubierto un nuevo retrovirus humano no-transformante que contenía una proteína principal p25 (Barré-Sinoussi et al., 1983), similar a la del virus HTLV-1 (*human T-cell leukemia virus*) que en 1981 y 1983 había descubierto el grupo de Gallo (Rho et al., 1981; Gallo et al., 1983), pero con diferentes propiedades antigénicas. Este nuevo tipo de virus fue denominado “virus asociado con linfadenopatía (LAV)”. Más tarde, Barré-Sinoussi y Montagnier aislaban en dos hermanos con hemofilia B tratados con factor VIII otros virus similares al LAV que denominaron “virus asociados con la inmunodeficiencia” (IDAV-1, IDAV-2) que presentaban una morfología típica de lentivirus tipo D (con un espacio interno cónico-cilíndrico claramente distinto del espacio interno esférico de los virus HTLV-I y HTLV-II) y una proteína p25 idéntica a la de LAV (Vilmer et al., 1984). En 1984, Gallo y colaboradores (Popovic et al., 1984; Gallo et al., 1984; Schüpbach et al., 1984; Sarngadharan et al., 1984) describían un nuevo tipo de virus semejante a los HTLV que compartía algunas propiedades con los HTLV-1 y HTLV-2, denominándolo HTLV-III que, sin embargo, presentaba mucha similitud con el LAV-1 de Barré-Sinoussi y Montagnier. Posteriormente, el grupo del Dr. Levy en San Francisco identificó en pacientes con SIDA y con linfadenopatía otro retrovirus del tipo D, del grupo lentivirus, estructuralmente relacionado con el LAV-1 y el HTLV-III (Levy et al., 1984). Finalmente, los grupos americanos y francés se pusieron de acuerdo en que LAV-1/IDAV-1/HTLV-III y ARV eran el mismo tipo de virus, de manera que en 1985 un consorcio internacional de taxonomía viral decidió la denominación definitiva de “virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (HIV-1)” (Wain-Hobson et al., 1985; Ratner et al., 1985; Coffin et al., 1986). ¿Cómo habría que interpretar el hecho de que Gallo reconociera que “probablemente” algunos cultivos de su laboratorio se habían contaminado con una muestra viral enviada por el Dr. Montagnier, tal como recogía al principio de este escrito?

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

En 1962, Watson y Crick recibieron, junto a Maurice H.F. Wilkins, el Premio Nobel en Fisiología o Medicina “por sus descubrimientos en relación con la estructura molecular de los ácidos nucleicos y su significación para la transmisión de la información en la materia viva”. El artículo original de Watson y Crick de 1953 apareció “escortado” por dos trabajos sobre modelos de difracción por rayos X realizados por Wilkins y colaboradores y por Rosalind E. Franklin. Watson tenía 25 años cuando se publicó el modelo estructural. Desgraciadamente, Rosalind Franklin, que sin duda alguna hubiera sido merecedora también del premio, había fallecido en 1958 de cáncer de ovario, a los 37 años de edad.

En el libro “*La doble hélice*” escrito en 1968 por Watson, el autor narra de forma autobiográfica sus experiencias vitales en torno al descubrimiento de la estructura del ADN, poniendo de manifiesto las intrigas, insidias y los manejos poco limpios del mundo científico. En esta obra se pueden encontrar, junto a páginas y hechos estimulantes, situaciones en las que la competitividad puede llevar a comportamientos no éticos. La cuestión ética que se plantea en relación con el descubrimiento de la doble hélice tiene que ver con el papel que jugó Rosalind Franklin en el descubrimiento del modelo. Watson y Crick tuvieron acceso, sin el conocimiento y autorización de Rosalind Franklin, de una fotografía que había obtenido ella sobre el modelo de difracción con rayos X del ADN que resultó clave para que aquellos pudieran proponer su modelo estructural de la doble hélice.

Watson y Crick realizaron su trabajo en el Cavendish Laboratory de Cambridge, mientras que Wilkins y Franklin lo llevaron a cabo en el King’s College de Londres, donde uno de los edificios lleva el nombre “Franklin-Wilkins”. Como dice su biógrafa Brenda Maddox, Rosalind Franklin nunca pudo imaginar que se dedicara en su honor un edificio en el King’s Collage donde pasó los dos años más desgraciados de su carrera profesional (Maddox, 2003). Por otro lado, como recuerdo y homenaje a esta científica se ha creado la *Medalla Rosalind Franklin* para premiar a investigadoras del Reino Unido, en un intento de restañar las heridas del pasado. Rosalind Franklin se ha convertido en un icono feminista de la investigación.

De forma anecdótica, en este contexto me viene a la memoria el caso de la variedad de trigo española “Dimas” que, al parecer, fue producto de una “distracción” de semillas de la variedad francesa “Etoile de Choisy”. Para mayor sarcasmo, el nombre de la variedad española responde al del “buen ladrón” del relato evangélico de la crucifixión. Cuando se discute acaloradamente sobre si “patentes, sí” o “patentes, no”, hay que tener presente

que las patentes protegen los derechos legítimos de los investigadores y los centros de investigación públicos o privados.

5.3. Genética y Cáncer

Bajo la denominación de *cáncer* se incluyen muchas enfermedades distintas, pero que tienen una característica común: las células se multiplican cuando no deberían hacerlo o a un ritmo de división anormal. En otras palabras, la célula cancerosa ha perdido la capacidad de controlar su crecimiento y división, de manera que se divide cuando y donde no debería hacerlo. Dada la importancia clínica y la incidencia del cáncer en la población humana, puede resultar chocante que sólo haya habido dos premios Nobel concedidos a investigadores que han trabajado en aspectos genéticos del cáncer.

El *Dogma Central de la Biología Molecular* (Crick, 1970) establece que el flujo de información genética ocurre en la dirección ADN→ARN→proteínas. Sin embargo, Howard M. Temin demostró que no siempre se cumple el dogma.

El virus del *sarcoma de Rous* es un virus ARN que produce cáncer de tejido conectivo en el pollo. Temin comprobó que la infección del virus ARN era inhibida por la actinomicina D -antibiótico que inhibe la síntesis de ARN a partir de un ADN molde, pero no la replicación del ARN a partir de otro ARN-, concluyendo que dicho virus podía replicarse a través de un ADN intermediario cuya información genética habría sido transferida, evidentemente, a partir del ARN viral. En 1964, Temin demostró, mediante hibridación de ácidos nucleicos ADN-ARN, la complementariedad de un ADN aislado en células de pollo infectadas con el virus del sarcoma de Rous. Sin embargo, al no conocerse en aquella época la existencia de sistema enzimático alguno capaz de sintetizar ADN a partir del ARN, sus hipótesis no fueron universalmente aceptadas hasta que logró demostrar la existencia de una enzima que realizaba la *transcripción inversa* (Temin and Mizutani, 1970). Simultáneamente, pero con un material biológico distinto (el virus ARN que produce la *leucemia de Rauscher* en el ratón), David Baltimore (1970) obtuvo resultados similares a los de Temin. Posteriormente otros investigadores demostraron que la enzima aislada por Temin presentaba la misma actividad en sistemas *in vitro* en los que se utilizaban como ARN molde polirribonucleótidos sintéticos (Gallo, 1971). La enzima fue inicialmente denominada como *ADN polimerasa-ARN dependiente*, pero dado que también tiene actividad de síntesis de ADN utilizando como molde ADN, Temin (1972) propuso la denominación más matizada de *ADN*

polimerasa-ARN dirigida. Puesto que la función que cataliza esta enzima es una transcripción en sentido inverso, se le llama normalmente *transcriptasa inversa*. Este tipo de enzimas se ha convertido en una útil herramienta en la Genética Molecular moderna para la obtención del *ADN copia (ADNc)* a partir del ARN mensajero.

Las investigaciones de Temin y Baltimore contribuyeron al conocimiento del comportamiento de estos virus oncogénicos, también denominados *virus ARN-ADN*, *ribodesoxivirus* o *retrovirus* (Temin and Baltimore, 1972; Temin, 1974). Muchos años más tarde, los retrovirus han vuelto a la actualidad puesto que incluyen al virus responsable de la inmunodeficiencia adquirida humana (*HIV*) que produce el SIDA (síndrome de inmunodeficiencia adquirida). Temin y Baltimore recibieron el premio Nobel en 1975, junto con su maestro Renato Dulbecco, “por sus descubrimientos en relación con la interacción entre los virus tumorales y el material genético en la célula”.

El estudio de los virus tumorales condujo al descubrimiento de los *oncogenes* como responsables del cáncer. Utilizando mutantes condicionales sensibles a la temperatura del virus del sarcoma de Rous, Martin (1970) descubrió la existencia del gen *src* como responsable de la transformación celular. Posteriormente se demostró que el producto de acción del gen *src* es una fosfoproteína de 60 kilodalton (*pp60-src*) que tiene una actividad enzimática proteína quinasa.

La casuística del fenómeno canceroso es tan variada que no podía ser explicada únicamente en términos de infección viral. Por ello, Huebner y Todaro (1969) propusieron la “hipótesis del oncogén”, sugiriendo que todas las células de los organismos llevan incorporadas en sus genomas los oncogenes de los retrovirus a partir de infecciones virales producidas en los primeros tiempos de la evolución. Si tal hipótesis fuera correcta ello significaría que en las células normales de los vertebrados debería encontrarse el gen *src*. Y así fue, en efecto: J. Michael Bishop, Harold E. Varmus y colaboradores, utilizando *ADNc* obtenido por transcripción inversa a partir del ARN del gen *src*, demostraron en 1976 que el ADN de pollos y otras aves no cancerosas hibridaba con el *ADNc* del gen *src*; es decir, el gen *src* (o una secuencia homóloga) estaba presente en las células normales (Stehelin *et al.*, 1976).

Aunque los descubrimientos mencionados aparentemente parecían corroborar la “hipótesis del oncogén” de Huebner y Todaro, sin embargo, hubo datos experimentales posteriores que invirtieron la explicación evolutiva del fenómeno, ya que los genes

celulares homólogos a los oncogenes virales tienen intrones y éstos no y, además, el gen se expresa en las células normales produciendo una proteína con estructura y función similares a la codificada por el gen viral *src*. Una explicación racional a estos hechos fue propuesta por Bishop (1981): en las células normales existen los *proto-oncogenes* u oncogenes celulares (*c-onc*) que codifican para proteínas cuya actividad es esencial para el normal funcionamiento de las células. Al producirse una infección por un retrovirus puede ocurrir que el virus incorpore en su genoma el oncogén celular, pasando a constituir un *oncogén viral* (*v-onc*). Para distinguir el gen *src* en ambas situaciones se representa como *c-src* y *v-src* y las proteínas codificadas como pp60c-*src* y pp60v-*src*, respectivamente.

Teniendo en cuenta la diversidad de datos experimentales disponibles -como que el oncogén *c-src* está presente y activo en las células normales; que algunos retrovirus no tienen el gen *v-src* y, sin embargo, pueden inducir la transformación celular; que la estimulación de oncogenes celulares por promotores virales desencadena el proceso canceroso; que las anomalías cromosómicas o los agentes químicos o físicos pueden tener efectos cancerígenos; etc.- Bishop (1982) propuso una teoría unificada que explicara todas las situaciones posibles, proponiendo así su *hipótesis de la dosis*: el oncogén celular (*c-onc*) determina la síntesis en cantidades adecuadas de una proteína requerida para el crecimiento y comportamiento normales de la célula, pero la producción de una cantidad anormalmente excesiva de la misma o la expresión inadecuada (mutación) del oncogén celular induce el proceso canceroso. La superproducción de la oncoproteína puede originarse por la integración en el genoma celular de un ADN de procedencia viral con o sin *v-onc*, por reordenamientos cromosómicos estructurales, por amplificación génica del *c-onc*. etc. En 1989, Bishop y Varmus recibieron el premio Nobel “por sus descubrimientos sobre el origen celular de los oncogenes retrovirales”.

En el contexto de los premios Nobel en relación con el cáncer, también sería correcto incluir las investigaciones de Hartwell, Hunt y Nurse que les valió el galardón en 2001 “por sus descubrimientos de los reguladores clave del ciclo celular”, puesto que del conocimiento de los controles genéticos que controlan el proceso normal de la división celular y el papel de las ciclinas se pueden inferir las causas de los procesos cancerosos (Hartwell and Kastan, 1994).

En 2008 recibió el premio Nobel Harald zur Hausen “por su descubrimiento de los virus del papiloma humano que causan el cáncer cervical”. En relación con el

descubrimiento del Dr. zur Hausen cabe destacar cómo sus investigaciones iban contra corriente frente a la opinión mayoritaria de la comunidad científica en la década de los setenta del siglo pasado que atribuía el cáncer cervical –que supone el segundo más frecuente entre los distintos tipos de cáncer que sufren las mujeres– al virus de tipo herpes simplex. En 1974, zur Hausen publicó su primer intento de encontrar ADN del virus de papiloma humano (HPV) en biopsias de cáncer cervical (Hausen et al., 1974), llegando más tarde a sospechar de la heterogeneidad genética de diversos tipos de virus HPV (Gissmann y Hausen, 1976). Sin embargo, fue a principios de la década de los ochenta, cuando el grupo de investigación del Dr. zur Hausen encontró que dos variantes del virus del papiloma humano (las HPV16 y HPV18) estaban presentes en más del 80% de los casos de cáncer cervical (Durst et al., 1983; Boshart et al., 1984). Además, sus investigaciones contribuyeron al conocimiento del mecanismo de la carcinogénesis inducida por el HPV y los factores que predisponen la persistencia viral y la transformación celular. Todo ello ha permitido el desarrollo de vacunas profilácticas que garantizan más de un 95% de protección frente al cáncer cervical producido por los subtipos 16 y 18 del HPV.

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

Finalmente, además del interés que tiene desde el punto de vista de la investigación citogenética básica el premio Nobel en Fisiología o Medicina 2009 sobre el papel de los telómeros y la telomerasa que se ha descrito en el apartado 3.2, no hay que olvidar su aplicación clínica en temas de cáncer y envejecimiento. Como se ha indicado en un epígrafe anterior (3.3), en este contexto hay que repetir aquí el papel que juega la telomerasa en el envejecimiento celular y el cáncer que fue descubierto por Szostak, Greider y colaboradores que les valió el premio en 2009. Dado que la ausencia en las

células de la enzima telomerasa podría repercutir en la viabilidad de las mismas, Szostak y Greider relacionaron la falta de actividad telomerasa con procesos de envejecimiento y muerte celulares (Lundblad y Szostak, 1989; Greider, 1990) así como la actividad extemporánea con la inmortalidad de las células en los procesos cancerosos (Greider, 1993).

5.4. Genética del desarrollo

Dentro de la Biología en general y de la Genética en particular, no hay duda de que el desarrollo de los organismos es uno de los temas más fundamentales y fascinantes; sin embargo, a pesar de su importancia, la institución Nobel solamente había premiado en 1935 a Hans Spemann “por su descubrimiento del efecto organizador en el desarrollo embrionario” de los anfibios. Tuvieron que pasar 60 años para que se premiaran las investigaciones sobre el control genético del desarrollo que les valieron el Premio Nobel en Fisiología o Medicina a Edward B. Lewis, Christiane Nüsslein-Volhard y Erick F. Wieschaus “por sus descubrimientos sobre el control genético del desarrollo temprano del embrión” (1995), a Sydney Brenner, H. Robert Horvitz y John E. Sulston “por sus descubrimientos sobre la regulación genética del desarrollo de los órganos y la muerte celular programada” (2002), a Richard Axel y Linda B. Buck por sus descubrimientos de los “receptores olfativos y la organización del sistema olfativo” (2004) y a Gurdon y Yamanaka (2012) por sus estudios sobre reprogramación celular, concretada en la transferencia nuclear (clonación) en anfibios y en la inducción de células troncales pluripotentes en ratón y en humanos, respectivamente.

Obviamente, en el ámbito de la Genética del desarrollo hay que hacer referencia al fenómeno de la regulación de la expresión génica, tanto en lo que se refiere al modelo del operón de Jacob y Monod (1965) como al papel del ARN de interferencia descrito por Fire y Mello (2006).

Todas estas investigaciones han sido tratadas con anterioridad en los epígrafes correspondientes (ver apartado 3.3).

Pasamos a considerar ahora algunos aspectos específicos del desarrollo como son la fecundación *in vitro* y la utilización de técnicas genéticas de análisis para el estudio de la fisiología celular:

a) *La fecundación in vitro en la especie humana*

En relación con el desarrollo, no cabe duda que el proceso de la fecundación in vitro (FIV) permite conocer los requerimientos para producir la vida en el laboratorio. La culminación de las investigaciones iniciadas en la fecundación in vitro en animales no mamíferos y después las llevadas a cabo en mamíferos no humanos (conejo, hámster, ratón) se produjo con las investigaciones de Robert G. Edwards que recibió el Premio Nobel de Fisiología o Medicina 2010 por sus estudios de la fecundación in vitro en la especie humana que le llevó, en colaboración con el ginecólogo Dr. Patrick C. Steptoe, al nacimiento del primer “bebé probeta” en 1978. Desde entonces al día de hoy se estima en más de 4.000.000 de niños nacidos en el mundo mediante la FIV.

Como antecedentes científicos hay que mencionar que los primeros estudios del proceso de fecundación in vitro en mamíferos se remontan a 1935 cuando Pincus estableció las condiciones experimentales que permitían la maduración in vitro de los ovocitos de coneja. Un cuarto de siglo después, en 1959, Chang obtuvo embriones viables de conejo tras la fecundación in vitro de ovocitos madurados in vitro que daban lugar a descendencia viable al ser transferidos al útero. Aunque al principio se creyó que era necesaria la activación (capacitación) de los espermatozoides in vivo (dentro del útero de la hembra), sin embargo, se demostró en hámster que los espermatozoides podían ser capacitados en medios adecuados in vitro sin necesidad de una activación in vivo (Yanagimachi y Chang, 1963).

Como se ha mencionado anteriormente, el galardonado Dr. Edwards estuvo trabajando durante varios años en la década de 1950 en Edimburgo en temas de fisiología reproductiva del ratón, especialmente en la maduración de ovocitos. Por ello, su formación era la adecuada cuando al final de la década de los 50 se le encargó en el National Institute for Medical Research de Londres que desarrollara un método que pudiera aliviar el problema de la infertilidad humana.

Para afrontar con éxito el proceso de fecundación in vitro en la especie humana había que solucionar varios problemas: 1) controlar el proceso de maduración de los ovocitos, 2) conseguir extraerlos en el estadio de desarrollo adecuado para la fecundación, 3) activar (capacitar) los espermatozoides in vitro, 4) definir las condiciones experimentales que promueven la fecundación y las primeras etapas del desarrollo embrionario in vitro, y 5) poner a punto las técnicas que permitan transferir los

embriones obtenidos al útero de la mujer. Los primeros frutos de sus investigaciones los obtuvo Edwards en 1965 cuando descubrió que los ovocitos humanos necesitan 24 horas de incubación *in vitro* antes de iniciar el proceso de maduración Edwards, 1965 a, 1965 b) y en 1969 cuando utilizó con éxito las condiciones de cultivo para la capacitación de los espermatozoides que les permitiera la fecundación de ovocitos madurados *in vitro* (Edwards *et al.*, 1969). Sin embargo, los embriones obtenidos no progresaban más allá del estadio de dos células. Por ello decidió que los ovocitos a utilizar deberían completar su proceso de maduración *in vivo*, pero el nuevo problema radicaba en cómo extraer de los ovarios los ovocitos maduros. Este obstáculo fue resuelto cuando se asoció con el ginecólogo Dr. Patrick C. Steptoe quien, en 1968, había puesto a punto la técnica de laparoscopia que permite extraer de los ovarios de la mujer ovocitos madurados *in vivo* (Steptoe, 1968). No tengo la menor duda de que, si hubiera vivido, el Dr. Steptoe habría compartido el Premio Nobel con el Dr. Edwards.

El premio se le ha concedido al Dr. Edwards casi cuarenta años después de que publicara en 1970 y 1971 en colaboración con el Dr. Steptoe los primeros trabajos científicos que describían la obtención de embriones humanos por fecundación *in vitro* (FIV) que eran capaces de desarrollarse hasta la fase de 8-, 16 células e, incluso, blastocisto (Steptoe y Edwards, 1970; Edwards *et al.*, 1970; Steptoe *et al.*, 1971). Tras estos éxitos científicos solicitaron una subvención a largo plazo al Medical Research Council para continuar sus investigaciones que, sin embargo, les fue denegada en abril de 1971 “...debido a que se tienen serias dudas sobre los aspectos éticos de dicha investigación en seres humanos, muy en especial de los experimentos relacionados con la implantación de los óvulos fecundados *in vitro* en las mujeres...También se han expresado reservas sobre la legitimidad del usar la laparoscopia con objetivos puramente experimentales. En consecuencia, hemos tenido que dar por desestimada su solicitud” (transcrito en Edwards y Steptoe, 1980, págs. 140-141). Para seguir adelante necesitaron fondos privados.

Tras más de cien intentos fallidos de transferencia de embriones al útero de la mujer, en 1976 transfirieron a una mujer un embrión FIV que no llegó a término porque se produjo un embarazo extrauterino (Steptoe y Edwards, 1976); sin embargo, más tarde, el 25 de julio de 1978 nació en el Hospital de Oldham Louise Joy Brown –el primer “bebé probeta” del mundo– sin anomalía alguna (Steptoe y Edwards, 1978). Es interesante

resaltar que, años después, la propia Louise Brown ha sido madre sin tener que recurrir a las técnicas de fecundación in vitro. Edwards y Steptoe escribieron en 1980 una narración autobiográfica de gran interés sobre los primeros años de sus investigaciones (Edwards y Steptoe, 1980) cuya lectura es apasionante.

En los años siguientes Edwards y Steptoe, que habían creado su propia clínica en Cambridge (Bourn Hall Clinic), refinaron la técnica y la extendieron por todo el mundo: en 1983 habían nacido ya por FIV en su clínica 139 niños, llegando a 1.000 en 1986. Por esta época habían nacido otros mil niños FIV en otros países. Ante el impacto social que supuso el nacimiento de Louise Joy Brown, el Gobierno del Reino Unido puso en marcha la Comisión Warnok para que analizara la cuestión. Al Informe Warnok hecho público en 1984 siguió la aprobación en 1990 de la *Human Fertilisation and Embryology Act* en el Reino Unido y la creación en 1991 de la *Human Fertilisation and Embryology Authority* como organismo responsable en dicho país de los temas referentes a la reproducción humana.

La concesión del Premio Nobel, a pesar de los años transcurridos, ha sido para honrar en vida al Dr. Edwards (tiene en la actualidad 85 años) y reconocer al mismo tiempo que la fecundación in vitro basada en sus pioneras investigaciones junto con el Dr. Steptoe han supuesto un paso importante en la Medicina Reproductiva. Las estadísticas mundiales indican que un 10% o más de las parejas son infértiles, que el 30-40% de los tratamientos FIV tiene éxito y que en muchos países con buen nivel médico los nacimientos mediante la técnica FIV suponen el 2-3% del total de nacimientos. Al día de hoy se estima que han nacido en el mundo unos 4.000.000 de niños por las técnicas de fecundación in vitro.

En España, el primer nacimiento por fecundación in vitro (la niña Victoria Anna) se produjo el 12 de julio de 1984 en el Instituto Dexeus de Barcelona (Dr. Pedro Barri, ginecólogo, y Dra. Anna Veiga, bióloga). Desde entonces y hasta 2009 se han producido más de 8.000 nacimientos por FIV en dicho Instituto (Barri y Veiga, 2009). Este nacimiento supuso el número 601 en el registro cronológico mundial.

Las investigaciones de los Dres. Edwards y Steptoe han sido la herramienta de trabajo utilizada por muchos científicos en campos como el del manejo de las células troncales pluripotentes embrionarias humanas iniciadas en 1998 (Thompson *et al.*, 1998).

b) *La Genética como técnica metodológica de análisis en la fisiología celular*

En este apartado se pueden incluir aquellas investigaciones que, no siendo estrictamente genéticas, han utilizado técnicas de aislamiento de mutantes que han permitido identificar los genes implicados en el proceso y a partir de ellos las proteínas involucradas en el proceso bioquímico objeto primario del campo de investigación galardonado con el premio Nobel. Es el caso de los mecanismos de transporte intracelular de vesículas y de la autofagia celular que fueron premiados en 2013 y en 2016, tal como se indica a continuación:

1. Transporte de vesículas en las células: control genético del tráfico celular

El 7 de octubre de 2013, la Asamblea Nobel del Instituto Karolinska de Estocolmo otorgó el Premio Nobel en Fisiología o Medicina conjuntamente a James E. Rothman (1950, USA, Yale University), Randy W. Schekman (1948, USA, University of California, Berkeley) y Thomas C. Südhof (1955, Alemania, Stanford University) “por sus descubrimientos de la maquinaria que regula el tráfico de vesículas, un sistema de transporte principal en nuestras células”.

Como señalaba el comunicado de prensa del Instituto Karolinska, el buen funcionamiento de las células depende de conseguir que las moléculas correctas estén en el lugar adecuado en el momento apropiado, teniendo en cuenta que algunas de tales moléculas son exportadas fuera de las células mientras que otras tienen que estar en lugares específicos de la propia célula.

Si fuéramos capaces de introducirnos físicamente en el interior de una célula nos quedaríamos maravillados al visualizar todos los procesos moleculares que ocurren en ella a gran velocidad y con total precisión. Pensemos, por ejemplo, en la replicación del ADN, la transcripción y síntesis del ARN mensajero, la síntesis de proteínas en la maquinaria ribosómica. También nos asombraría ver cómo las moléculas sintetizadas en la célula (enzimas, hormonas, neurotransmisores, citokinas, etc.) son transportadas en vesículas a lugares específicos (orgánulos) de la propia célula o liberadas al exterior de la misma en el momento justo.

En los comentarios escritos para explicar en qué han consistido las investigaciones de los tres científicos galardonados se ha repetido el ejemplo de un gran puerto en el que hay que distribuir ingentes cantidades de mercancías para que lleguen al destino correcto

en el tiempo preciso, para lo cual se requiere un sistema de reparto adecuado que genera un denso tráfico interior que tiene que estar perfectamente regulado. Pues bien, volviendo al terreno biológico, las moléculas son empaquetadas en vesículas minúsculas recubiertas con membranas para su transporte a los diferentes lugares específicos de la célula o para ser exportadas al exterior de la misma.

Las investigaciones premiadas se refieren a tres aspectos diferentes, pero a la vez complementarios, de la cuestión global: 1) la existencia de una regulación genética que controla el tráfico de las vesículas (Schekman); 2) la existencia de complejos proteicos que permiten a las vesículas anclarse en el lugar preciso y fusionarse con las membranas celulares o intracelulares (Rothman); y 3) la existencia de un mecanismo molecular dependiente del calcio en la transmisión entre células nerviosas (Südhof).

De las tres investigaciones premiadas yo solamente me siento legitimado para hacer un breve comentario sobre la aportación de Randy W. Schekman quien descubrió los genes que codifican para las proteínas que son los reguladores clave del tráfico de vesículas en levaduras, controlando el transporte tanto a los diferentes compartimentos internos celulares (del retículo endoplásmico al aparato de Golgi) como a la superficie celular. Interesado por cómo las células organizan su sistema de transporte, Schekman decidió iniciar en los años setenta un estudio genético utilizando como sistema modelo mutantes de levadura sensibles a la temperatura (Novick y Schekman, 1979). Posteriormente identificó 23 grupos de complementación implicados en los sucesos post-traduccionales de la ruta secretora de la levadura (Novick *et al.*, 1980) y estableció el orden de los sucesos que ocurrían en el patrón secretor de las células de levadura (Novick *et al.*, 1981). En un estudio posterior, Schekman y colaboradores caracterizaron morfológicamente y genéticamente las mutaciones en siete genes SEC demostrando que pueden jugar un papel en la formación o en la fusión de vesículas intermedias en el transporte de proteínas desde el retículo endoplásmico al aparato de Golgi (Kaiser y Schekman, 1990).

Es interesante hacer constar que las investigaciones realizadas en células de mamíferos por Rothman (Balch *et al.*, 1984; Sollner *et al.*, 1993), con quien ha compartido el galardón Nobel, sobre los complejos proteicos que permiten a las vesículas fusionarse con sus dianas en las membranas asegurando que las moléculas que las vesículas transportan (moléculas-cargo, moléculas-mercancía) sean liberadas en el lugar preciso

han demostrado que incluyen proteínas semejantes a las descritas por Scheckman codificadas por genes homólogos. Es decir, se trata de procesos del sistema de transporte celular conservados en la evolución.

Aunque la investigación de los galardonados con el Premio Nobel 2013 en Fisiología o Medicina pertenece al campo de la Biología y la Fisiología Celular –de hecho, es la tercera vez desde que George Palade, Albert Claude y Christian de Duve obtuvieron el Premio Nobel en 1974 y Günter Blobel en 1999 en que este campo científico es galardonado con el Premio Nobel en Fisiología o Medicina– sin embargo en el caso del Dr. Scheckman me he permitido incluirlo también en el campo de la Genética por la metodología genética clásica que ha utilizado para seleccionar los mutantes de levadura que han constituido su material de trabajo imprescindible para llevar a cabo sus estudios citológicos. Confirma mi criterio el mismo hecho de que el Dr. Schekman eligiera como título de su Nobel Lecture “Genes and proteins that organize the secretory pathway” (7 diciembre 2013).

2. *Autofagia celular*

El 3 de octubre, la Asamblea Nobel en el Instituto Karolinska decidió otorgar el Premio Nobel en Fisiología o Medicina 2016 al Dr. Yoshinori Ohsumi “por sus descubrimientos de los mecanismos para la autofagia”.

Nos podemos remontar a más de 60 años cuando se iniciaron una serie de descubrimientos sobre la fisiología y estructura celulares que finalizaron con los fenómenos de autofagia celular que ahora nos ocupan. En efecto, en 1955 y 1956, Christian de Duve descubrió que enzimas proteolíticas celulares eran secuestradas en unas estructuras de membrana, hasta entonces desconocidas, que él denominó *lisosomas*. Investigaciones posteriores demostraron que había otras estructuras de membrana que secuestraban porciones de citoplasma. Dado que tales estructuras tenían la capacidad de digerir partes del contenido intracelular, Christian de Duve eligió el término de *autofagia* para denominar tales procesos. Como se mencionaba anteriormente, Christian de Duve recibió, junto con Albert Claude y George E. Palade, el Premio Nobel en Fisiología o Medicina 1974 “por sus descubrimientos relativos a la organización estructural y funcional de la célula”.

- A modo de inciso, se puede mencionar en este contexto que otros fenómenos relativos a la organización funcional y estructural de las células han sido merecedoras del galardón Nobel en ocasiones anteriores, como es el caso del aparato de Golgi (Golgi y Ramón y Cajal recibieron el Premio Nobel en Fisiología o Medicina 1906 “en reconocimiento de su trabajo sobre la estructura del sistema nervioso”), de las ciclinas y el control del ciclo celular (Hartwell, Hunt y Nurse recibieron el Premio Nobel en Fisiología o Medicina 2001 “por sus descubrimientos de los reguladores clave del ciclo celular”), de la apoptosis (Brenner, Horvitz y Sulston recibieron el Premio Nobel en Fisiología o Medicina 2002 “por sus descubrimientos sobre la regulación genética del desarrollo de los órganos y la muerte celular programada”) o el tráfico de vesículas en las células (Rothman, Schekman y Südhof fueron galardonados con el Premio Nobel en Fisiología o Medicina 2013 “por sus descubrimientos de la maquinaria que regula el tráfico de vesículas, un sistema de transporte principal en nuestras células”).

Particularmente, este año de 2016 parecía que los amantes de la Genética íbamos a tener la satisfacción de disfrutar de otro premio Nobel en temas estrictamente genéticos, como bien podría haber sido la “edición genómica”. Pero no ha sido así. No obstante, como una pequeña compensación, a mí, en particular, me ha consolado ver cómo la Genética ha estado presente en la investigación premiada este año porque la metodología de trabajo ha incluido la utilización de mutantes genéticos de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. En efecto, estudiando miles de levaduras mutantes, el Dr. Ohsumi identificó 15 genes que son esenciales para la autofagia, permitiéndole estudiar la función de las proteínas codificadas por tales genes (Takeshige *et al*, 1992; Tsukada y Ohsumi, 1993). Él pudo analizar cómo las señales de estrés inician el proceso de la autofagia celular y el mecanismo por el que las proteínas y los complejos proteicos promueven los diferentes estadios de la formación de los *autofagosomas* a partir de una estructura de doble membrana denominada *fagóforo*. Algo así como las bolsas de la basura con la que las células recogen los desperdicios para llevarlos a los lisosomas donde serán degradados y posteriormente reciclados.

Como señalaba la propia institución Nobel en la nota de prensa que anunciaba el premio, “gracias a Ohsumi y otros que han seguido sus huellas, ahora sabemos que la autofagia controla importantes funciones fisiológicas en las que algunos componentes celulares tienen que ser degradados y reciclados. La autofagia puede proporcionar rápidamente el combustible para la energía y los bloques de construcción para renovar

componentes celulares y es, por tanto, esencial para la respuesta celular al ayuno y otros tipos de estrés. Después de la infección, la autofagia puede eliminar a las bacterias y virus que invaden la célula. Además, la autofagia contribuye al desarrollo embrionario y a la diferenciación celular. Las células también usan la autofagia para eliminar proteínas y orgánulos dañados como mecanismo de control de calidad crítico para contrarrestar el efecto del envejecimiento. Fallos en la autofagia han sido relacionados con enfermedades neurodegenerativas de la vejez como el Parkinson, la diabetes tipo 2 o el cáncer.”

5.5. Genética aplicada a la Mejora de Plantas

“La experiencia de la fecundación artificial, tal como se realiza en plantas ornamentales para obtener nuevas variedades en el color, han conducido a los experimentos que se van a describir aquí”. Con estas palabras empieza Mendel (1866) su trabajo fundamental “Experimentos sobre híbridos de plantas”, que hoy se considera la piedra angular de la Genética. Para entender en profundidad estas palabras hay que estar en antecedentes del *porqué* del trabajo de Mendel (ver Lacadena, 1986).

En 1825, la Academia de Ciencias de Holanda ofreció un premio para quien diera una contestación a la siguiente pregunta. “¿Qué enseña la experiencia en relación a la producción de nuevas especies y variedades por medio de la fecundación artificial de flores de una con polen de otra y qué plantas económicas y ornamentales pueden ser producidas y multiplicadas de este modo?”. El concurso se resolvió en 1837 y el ganador fue C.F. von Gärtner, hibridista experimental, sucesor directo de otro hibridista, G.J.G. Kölreuter. Pero, ¿qué relación tienen estos hibridistas con Mendel? Si continuamos leyendo el principio del trabajo de Mendel nos encontramos la siguiente frase: “A este objeto (estudiar los híbridos en su descendencia) han dedicado parte de su vida, con inagotable perseverancia, cuidadosos observadores como Kölreuter, Gärtner, y otros”. Y más adelante, cuando en el penúltimo párrafo de la introducción trata de justificar el *porqué* de su trabajo, dice Mendel: “En realidad requiere cierto ánimo emprender un trabajo tan extenso; no obstante, hacerlo parece ser la única vía buena para alcanzar finalmente la *solución de una cuestión* de tanta importancia en relación con la historia de la *evolución de los seres orgánicos*” (la cursiva es mía). La *cuestión* a la que hacía referencia Mendel era la controversia, entonces en su punto álgido, entre los hibridistas experimentales sobre si pueden aparecer nuevas especies a partir de la hibridación de otras especies preexistentes. Algunos historiadores de la ciencia

como Olby (1985) creen que Mendel trataba de dilucidar con sus experimentos entre las ideas evolucionistas de Franz Unger -que fue su profesor de Fisiología Vegetal en la Universidad de Viena- y las ideas fijistas de los hibridistas experimentales más famosos como Kölreuter y Gärtner.

Dice Ramón y Cajal (1897) en sus *“Reglas y consejos sobre investigación científica”* que “...mucho aprendemos en los libros, pero más aprenderemos en la contemplación de la naturaleza, causa y ocasión de todos los libros”. Y así es como, al principio inconscientemente y luego con plena conciencia y base científicas, lo que la Mejora Genética hace es imitar los procesos evolutivos naturales, pero dirigiéndolos hacia un fin concreto: la obtención de los genotipos de las plantas cultivadas y de los animales domésticos que resulten más beneficiosos para el hombre en un ambiente y circunstancias determinadas (Lacadena, 1970).

El paralelismo entre la Mejora y la Evolución puede esquematizarse de la siguiente manera:

<u>Mecanismo evolutivo</u>	<u>Método de Mejora</u>
Hibridación espontánea	Cruzamiento artificial
Introgresión de genes	Retrocruzamiento, transgénesis
Heterocigosis y heterosis	Híbridos
Mutación	Mutagénesis artificial
Migración	Importación de genes
Selección natural	Selección artificial
Variaciones cromosómicas estructurales y numéricas	Técnicas citogenéticas

Si a todas estas consideraciones que venimos haciendo añadimos el origen de la Genética -que hemos mencionado al principio de este trabajo- como consecuencia de la actividad de los mejoradores y criadores de plantas y animales (“International Conference on Hybridization”, Londres, 1899; “International Conference on Plant Breeding and Hybridization”, Nueva York, 1902 y “Conference on Hybridization and Plant Breeding”, Londres, 1906), parece de justicia que la investigación genética aplicada a la Mejora de Plantas haya sido merecedora también de un premio Nobel. Tal fue el caso de Norman E.

Borlaug quien en 1970 recibió el premio Nobel de la Paz por su contribución a la “revolución verde”. Las variedades de trigo que Borlaug y colaboradores obtuvieron en el CIMMYT (Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo) de México duplicaron y hasta triplicaron la producción en el propio México, en la India y en Paquistán, contribuyendo a remediar el hambre en extensas zonas del mundo. El título de su Conferencia Nobel –“La revolución verde, paz y humanidad”– contiene las ideas de lo que siempre deberían ser las aplicaciones de los descubrimientos genéticos.

El hecho de que no se hayan cumplido las profecías de Thomas Robert Malthus (*“Un ensayo sobre el principio de población”* 1798, 1ª ed.; 1803, 2ª ed.; 1826, 6ª ed.) que vaticinaban una catástrofe para la humanidad, dado que la población humana crecía en progresión geométrica mientras que los recursos alimentarios lo hacían en progresión aritmética, es atribuible no sólo a los adelantos tecnológicos de la Agricultura sino también a los éxitos en la Mejora Genética representados por Norman E. Borlaug, Premio Nobel de la Paz 1970.

En el presente contexto es obligado recordar algunos datos estadísticos:

- en 1999 la población mundial alcanzó los 6.000 millones de habitantes
- en 2011 la población mundial alcanzó los 7.000 millones de habitantes
- en 2015 la población mundial alcanzó los 7.200 millones de habitantes. En la actualidad, el hambre afecta a 870 millones de personas y la malnutrición a 2.000 millones.
- se estima que para 2050 se necesitará un 60% más de alimentos para una población de 9.600 millones de habitantes.

El reto es difícil de vencer, pero tengamos fe en que será posible.

5.6. Haciendo predicciones

Es muy posible que todos los expertos estén de acuerdo en que, antes o después, algunos temas de investigación genética serán objeto de distinción por parte de la institución Nobel. Yo me atrevería a mencionar algunos campos específicos como es la *genómica*. Más difícil es, sin embargo, aventurar qué investigación y qué científicos concretos tendrán la fortuna de ver reconocido su trabajo con el más prestigioso galardón mundial puesto que, a veces, se premia a los pioneros que tuvieron la idea luminosa y

fecunda en tal o cual campo de investigación, mientras que en otras ocasiones el reconocimiento se lo llevan quienes supieron aplicar tales ideas básicas.

Permítaseme finalizar este apartado preguntándome en voz alta ¿para cuándo espera la Institución Nobel premiar la investigación genómica? En mi opinión, de los grandes temas actuales de investigación dentro de la Genética, la Genómica es el único que falta por recibir el galardón Nobel. En ocasiones anteriores me he atrevido a citar a J. Craig Venter como merecedor del premio Nobel por su contribución al desarrollo del Proyecto Genoma Humano, a la Metagenómica y a la Genómica Sintética. Me pregunto si su controvertida personalidad puede ser la causa de que se esté retrasando la decisión porque es evidente que no se puede premiar este campo de la investigación genética dejando fuera al Dr. Venter. Esto no es óbice para reconocer que la técnica de la “edición genómica” será premiada a no mucho tardar.

6. HEREJÍAS GENÉTICAS Y LOS PREMIOS NOBEL

Popper estableció su “criterio de demarcación” como la línea fronteriza que separa las ciencias empíricas –la Genética en nuestro caso– de otras formas de conocimiento; es decir, en aquéllas las hipótesis son contrastables (*falsabilidad* de la hipótesis) y en éstas no. En otras palabras, una hipótesis científica es cierta –o, mejor dicho, puede aceptarse como verdadera– mientras no se demuestre que es falsa. Por otro lado, una hipótesis no tiene que ser necesariamente correcta para que sea útil a la ciencia ya que el avance de la misma a veces se debe más a la falsabilidad de las hipótesis que a su corroboración.

Hay varias formas de llegar a alcanzar el premio Nobel. Una, es por acumulación de trabajos de investigación a lo largo de toda una vida y la creación de una escuela importante de discípulos; otra forma más directa es realizar un experimento que eche por tierra los principios científicos supuestamente bien establecidos de una disciplina (ver Cuadro 6)

CUADRO 6. HEREJÍAS GENÉTICAS Y LOS PREMIOS NOBEL

Los genes son ADN (1952): Hershey (1969)

Transcripción inversa, flujo de información ARN → ADN (1964, 1970): Temin y Baltimore (1975)

Elementos genéticos móviles (1951): McClintock (1983)

Genes discontinuos, intrones y exones (1977): Sharp y Roberts (1993)

Actividad catalítica del ARN (1981, 1983): Altman y Cech (1989)

Un gen → varias proteínas, reordenación de los genes de inmunoglobulinas (1976): Tonegawa (1987)

Ocurre a veces, que los científicos tienden a dogmatizar. Los dogmas son totalmente válidos en las creencias personales, pero no en las ciencias positivas. Dentro de la Genética se han postulado en diversas ocasiones asertos que parecían inamovibles (“dogmas” genéticos) hasta que algún científico “hereje” se atrevía a alzar su voz experimental contra ellos (ver Lacadena, 1984a). Sin ir más lejos, resulta chocante que se hable del *Dogma central de la Biología Molecular* (Crick, 1970) al que he hecho referencia en varias ocasiones. Pues bien, cuando Temin sugirió la posibilidad de que en ciertos virus se producía un cambio en la dirección del flujo de información genética (ARN→ADN, *transcripción inversa*), la comunidad científica acogió con frialdad su hipótesis porque iba en contra del “orden

establecido”. Lo mismo sucedió con Barbara McClintock, que sufrió la incomprensión general de la comunidad científica cuando postuló en los años cincuenta la existencia de los *elementos genéticos móviles*. Entre sus datos biográficos se cuenta la anécdota siguiente: Cuando expuso su teoría en un congreso científico le preguntaron a un genético eminente qué opinaba sobre lo que había expuesto Barbara McClintock y contestó: “No he entendido absolutamente nada, pero si lo dice Barbara será verdad”. Lo malo de ser acusado de hereje es que le quemaron en la hoguera a uno antes de que se demuestre que tenía razón en lo que decía. Afortunadamente para ella, vivió lo suficiente para que a sus 81 años pudiera recibir el premio Nobel de su “herejía” en 1983.

Establecida la *hipótesis de la secuencia* (Crick, 1958) y demostrada la correlación entre la ordenación lineal de las bases en el ADN y la de los aminoácidos en las proteínas, parecía quedar perfectamente establecido que un gen era un segmento continuo de ADN. Por ello, era una “herejía” genética la propuesta de Sharp y de Roberts sobre la existencia de *genes en piezas* que, sin embargo, les valió el premio Nobel en 1993. La *hipótesis un gen-una enzima*, que les valió el premio Nobel a Beadle y Tatum en 1958, implicaba la relación biunívoca un gen-una proteína o, más precisamente, un cistron-un polipéptido. Cuando se demuestra la existencia del *splicing* alternativo como consecuencia de la estructura discontinua de los genes, el “dogma” un gen-una proteína se ve cuestionado por la herejía “un gen-varias proteínas”. Pero las cosas no quedan ahí: el *trans-splicing* significa la herejía contraria “varios genes-una proteína”. También se inscribe en esta última herejía la propuesta de Dreyer y Bennett (1965) respecto a la formación de las cadenas de las inmunoglobulinas en las que -decían- dos genes distintos, *C* y *V*, codificaban para las regiones constantes y variables de cada polipéptido. Tonegawa recibió el premio Nobel en 1987 cuando demostró el *mecanismo de reordenación del ADN* de los segmentos *V* y *C*.

Una última “herejía” en la que están implicados los premios Nobel afecta a una de las esencias de la Bioquímica: la actividad enzimática no está reservada en exclusiva a las proteínas, sino que el *ARN* puede tener también *actividad catalítica*, como demostraron Altman y Cech y por ello recibieron el galardón en 1989. Y, por si fuera poco, parece que el ADN no quiere quedarse atrás ya que se ha demostrado su actividad catalítica (Cuenod and Szostak, 1995).

7. EPÍLOGO

El nombre de (Gregor) Johann Mendel (1822-1884) pertenece al patrimonio de la historia de la humanidad, pudiendo incluirse junto con los de aquellos que han contribuido al conocimiento de las leyes que gobiernan nuestro sistema vital. Las ideas y descubrimientos de Copérnico (1473-1543), Kepler (1571-1630), Galileo (1564-1642) y Newton (1642-1727) condujeron de forma gradual a la concepción del universo como un sistema de materia en movimiento gobernado por leyes naturales. Darwin (1809-1882) completó la revolución copernicana al extender a los seres vivos dicha concepción del universo, explicando la diversidad y adaptación de los organismos como resultado de un proceso natural de selección e incluyendo al hombre dentro de ese mismo sistema en evolución. Una de las lagunas de la teoría darwiniana era su desconocimiento sobre el verdadero mecanismo de la herencia. Fue la aportación científica de Mendel la que contribuyó a tapar ese hueco fundamental.

La personalidad y el polifacetismo científico de Mendel son ciertamente apasionantes. Con ocasión de la conmemoración del centenario de su muerte (6 enero 1884) tuve ocasión de profundizar en el estudio de su figura humana y científica (Lacadena, 1984c, 1986) y descubrí entonces a un Mendel desconocido para mí (y pienso que para la mayoría de los profesionales de la Genética). Por eso titulé uno de mis artículos como “Mendel, ese desconocido”.

Cuando se piensa en Mendel normalmente se le asocia exclusivamente con los guisantes, como si esa hubiera sido la única especie de plantas con las que había trabajado; sin embargo, nada más lejos de la realidad pues Mendel trabajó con casi noventa especies diferentes de plantas pertenecientes a cerca de 30 géneros. También trabajó con especies animales como la abeja y el ratón e, incluso, hizo algún tipo de estudio en la especie humana respecto a ciertas características familiares (estatura, cabello, etc.), estudiándolas en alguna familia de Brünn y en la suya propia. En su biografía se cita que en una de sus habitaciones criaba ratones blancos y grises, quizás con el propósito de extender sus experimentos de hibridación.

A las abejas les dedicó una especial atención. Fue miembro fundador en 1869 de la Sociedad Apícola de Brünn y en 1871 mandó construir en la huerta del monasterio del que

era abad un colmenar de 50 colmenas, que todavía se conserva. Incluso, parece ser que llegó a publicar algunas experiencias científicas en la revista “Abeja obrera”.

Al finalizar este trabajo en el que he tratado de hacer un estudio conceptual y metodológico de la ciencia Genética desde el punto de vista de las aportaciones de los investigadores genéticos y de campos afines galardonados con el premio Nobel, me parece oportuno terminar con las mismas palabras que utilicé con ocasión del centenario de la muerte de Mendel (Lacadena, 1984a, c): de entre todos los galardones científicos es, sin duda, el premio Nobel el más importante, siendo de destacar que 90 científicos pertenecientes a diferentes campos de la Genética y afines a ella hayan recibido en 38 ocasiones dicho premio, tanto de Fisiología y Medicina o Química como, incluso, el de la Paz.

A mí me gustaría creer que si la Fundación Nobel pudiera conceder sus premios a título póstumo -hay un caso excepcional en toda su historia- le otorgaría el premio a Gregor Johann Mendel “por su contribución fundamental al nacimiento de una nueva ciencia -la Genética- al establecer los principios básicos de la herencia de los caracteres en los seres vivos, constituyendo la piedra angular sobre la que se ha construido todo el edificio de la propia Genética, fuente y ocasión de numerosos premios Nobel”.

No puedo terminar este trabajo sin mostrar mi orgullo de pertenecer a un ámbito del conocimiento científico como es la Genética merecedora del más alto reconocimiento como son los premios Nobel. En efecto, teniendo en cuenta que la institución de los premios Nobel en 1901 coincide prácticamente con el nacimiento de la Genética con el redescubrimiento de las leyes de Mendel en 1900, es perfectamente posible seguir la historia de la Genética como una historia “nobelada”, que fue precisamente el título de mi discurso de ingreso en la Real Academia Nacional de Farmacia en 1995.

Como se ha indicado anteriormente, hoy, en 2016, podemos estar orgullosos los amantes de la Genética porque ya son 45 las veces en que el galardón Nobel ha correspondido a 98 científicos del campo de la Genética o ciencias afines. De los 45 premios considerados, 35 pertenecen al ámbito de la Fisiología o Medicina, 9 a la Química y 1 de la Paz y, a su vez, de los 98 científicos galardonados, 76 corresponden a premios de Fisiología o Medicina, 21 de Química y 1 de la Paz.

Finalmente, me gustaría destacar que en lo que va de siglo XXI se ha premiado la investigación genética en dieciséis ocasiones: en 2001 (Hartwell, Hunt y Nurse, “por sus descubrimientos de los reguladores clave del ciclo celular”), 2002 (Brenner, Horvitz y Sulston, “por sus descubrimientos sobre la regulación genética del desarrollo de los órganos y la muerte celular programada”), 2004 (Axel y Buck, “por sus descubrimientos de receptores olorosos y la organización del sistema olfativo”), 2006 (Fire y Mello, “por su descubrimiento de la interferencia por ARN: silenciamiento de genes por ARN de doble cadena”), 2006 (Kornberg, “por sus estudios de la base molecular de la transcripción eucariótica”), 2007 (Capecchi, Evans y Smithies, “por sus descubrimientos de los principios para introducir modificaciones génicas específicas en ratones mediante el uso de células troncales embrionarias”), 2008 (zur Hausen, “por su descubrimiento de los virus del papiloma humano causantes del cáncer cervical”; Barré-Sinoussi y Montagnier, “por su descubrimiento del virus de la inmunodeficiencia humana”), 2008 (Shimomura, Chalfie y Tsien, “por el descubrimiento y desarrollo de la proteína fluorescente verde, GFP”), 2009 (Blackburn, Greider y Szostack, “por el descubrimiento de cómo los cromosomas son protegidos por los telómeros y la enzima telomerasa”), 2009 (Ramakrishnan, Steitz y Yonath, “por los estudios de la estructura y función del ribosoma”), 2010 (Robert G. Edwards, “por el desarrollo de la fecundación in vitro”), 2011 (Bruce A. Beutler y Jules A. Hoffmann “por sus descubrimientos en relación con la activación de la inmunidad innata”; y a Ralph M. Steinman “por su descubrimiento de la célula dendrítica y su papel en la inmunidad adaptativa”, 2012 a John B. Gurdon y Shinya Yamanaka “por el descubrimiento de que las células diferenciadas pueden ser reprogramadas para convertirse en pluripotentes”, 2013 a Randy W. Schekman que compartió el premio con James E. Rothman y Thomas C. Südhof “por sus descubrimientos de la maquinaria que regula el tráfico de vesículas, un sistema principal de transporte en nuestras células” 2015 a Tomas Lindahl, Paul Modrich y Aziz Sanchar “por sus estudios de los mecanismos de reparación del ADN” y, finalmente, en 2016 a Yoshinori Ohsumi “por sus descubrimientos de los mecanismos para la autofagia”.

Sin duda, es una década prodigiosa para la Genética como una Alicia en el “País de las maravillas moleculares” que diría Lewis Carroll. En 1995 inicié con mi discurso de ingreso en esta Real Academia Nacional de Farmacia (Lacadena, 1995a) la historia “nobelada” de la Genética que tuve la oportunidad de actualizar doce años después,

(Lacadena, 2007) y que he puesto al día en 2016. No obstante, al paso que vamos, es posible que pronto se vuelva a quedar viejo y quién sabe si de aquí a diez años estaré escribiendo una tercera *addenda* de mi visión “nobelada” de la historia de la Genética que comencé hace dos décadas.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AASEN, T.; RAYA, A.; BARRERO, M.J.; GARRETA, E.; CONSIGLIO, A.; GONZÁLEZ, F.; VASSENA, R.; BILIC, J.; PEKARIK, V.; TISCORNIA, G.; EDEL, M.; BOUÉ, S.; IZPISÚA BELMONTE, J.C. 2008. Efficient and rapid generation of induced pluripotent ítem cells from human keratinocytes. *Nature Biotechnology*, 26:1276-1278
- ADAMS, J.M.; CORY, S. 1998. The Bcl-2 protein family: Arbiters of cell survival. *Science*, 281:1322-1326
- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; WATSON, J.D.; 1989. *Molecular Biology of the Cell* (Second edition). Garland Publishing, Inc., New York & London, XXXV+1219 pp+I-44
- ALIPIO, Z.; LIAO, W.; ROEMER, E.J.; WANER, M.; FINK, L.M.; WARD, D.C.; MA, Y. 2010. Reversal of hyperglycemia in diabetic mouse models using induced-pluripotent stem (iPS)-derived pancreatic β -like cells. *Proc. Nat. Acad. Sci.*:doi:10.1073/pnas.1007384107 (6 julio 2010)
- ALTMANN, R. 1889. Über Nucleïnsäuren. *Arch. Anat. Physiol. Abt. Physiol.*, 1889:524-536
- ALTMAN, S.; BAER, M.; GUERRIER-TAKADA, C.; VIOQUE, A. 1986. Enzymatic cleavage of RNA by RNA. *Trends Biochem. Sci.*, 11:515
- ANDERSON, K.V.; BOKLA, L.; NÜSSLEIN-VOLHARD, C. 1985a. Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: the induction of polarity by the *Toll* gene product. *Cell*, 42:791-798
- ANDERSON, K.V.; JURGENS, G.; NÜSSLEIN-VOLHARD, C. 1985b. Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: Genetic studies on the role of the *Toll* gene product. *Cell*, 42:779-789
- ANDERSON, K.V.; NÜSSLEIN-VOLHARD, C. 1984. Information for the dorsal-ventral pattern of the *Drosophila* embryo is stored as maternal mRNA. *Nature*, 311:223-227
- ANDERSON, S.; BANKIER, A.T.; BARRELL, B.G.; DE BRUIJN, M.H.L.; COULSON, A.R.; DROUIN, J.; EPERON, I.C.; NIERLICH, D.P.; ROE, B.A.; SANGER, F.; SCHREIER, P.H.; SMITH, A.J.H.; STANDEN, R.; YOUNG, I.G. 1981. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*, 290:457-465
- ARBER, W. 1974. DNA modification and restriction. *Prog. Nucl. Acid. Res. Mol. Biol.*, 14:1-37
- ASHKENAZI, A.; DIXIT, V.M. 1998. Death receptors: Signaling and modulation. *Science*, 281:1305-1308
- AUERBACH C.; ROBSON, J.M. 1946. Chemical production of mutations. *Nature*, 157:302
- EVERY, O.T.; MACLEOD, C.M.; MCCARTY, M. 1944. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. Induction to transformation by a deoxyribonucleic acid fraction isolated from *Pneumococcus* Type III. *J. Expl. Med.*, 79:137-158
- AYALA, F.J. 1980. En *Modern Genetics* (F.J.Ayala and J.A.Kiger,Jr.), *The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. Menlo Park, California*, XVII+844 pp.
- AYALA, F.J. 1984. El método científico en Mendel. En *En el centenario de Mendel: La Genética ayer y hoy* (coord. J.R.Lacadena), *Editorial Alhambra, S.A., Madrid*, pp. 85-101

- BALCH, W.E.; DUNPHY, W.G.; BRAELL, W.A.; ROTHMAN, J.E. 1984. Reconstitution of the transport of protein between successive compartments of the Golgi measured by the coupled incorporation of N-acetylglucosamine. *Cell*, 39:405-416
- BALTIMORE, D. 1970. An RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumor viruses. *Nature*, 226:1209
- BAN, N.; FREEBORN, B.; NISSEN, P.; PENEZEK, P.; GRASSUCCI, R.A.; SWEET, R.; FRANK, J.; MOORE, P.B.; STEITZ, T.A. 1998. A 9Å resolution X-ray crystallographic map of the large ribosomal subunit. *Cell*, 93:1105-1115
- BAN, N.; NISSEN, P.; HANSEN, J.; CAPEL, M.; MOORE, P.B.; STEITZ, T.A. 1999. Placement of protein and RNA structures into a 5Å-resolution map of 50S ribosomal subunit. *Nature*, 400:841-847
- BAN, N.; NISSEN, P.; HANSEN, J.; MOORE, P.B. and STEITZ, T.A. 2000. The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution. *Science*. 289: 902-920
- BARRÉ-SINOUSI, F.; CHERMAN, J.C.; REY, F. ; NUGEYRE, M.T. ; CHAMARET, S. ; GRUEST, J. ; DAUGUET, C. ; AXLER-BLIN, C. ; VÉZINET-BRUN, F. ; ROUZIOUX, C. ; ROZENBAUM, W.; MONTAGNIER, L. (1983): Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*, 220:868-871
- BARRI, P.N.; VEIGA, A. 2009. Victoria Anna, la primera niña concebida por fecundación in vitro en España, cumple 25 años. *Salud de la Mujer Dexeus, Departamento de Obstetricia, Ginecología y Reproducción, USP Institut Universitari Dexeus, Barcelona.(página web)*
- BATESON, W. 1894. Materials for the study of variation treated with especial regard to discontinuity in the origin of species. *Mcmillan, London*
- BATESON, W.; SAUNDERS, E.R. 1902. Experimental studies in the physiology of heredity. *Rep. Evol. Comm. Roy. Soc.*, 1:1-160
- BEADLE, G.W. 1946. Genes and the chemistry of organism. *Am. Scientist*, 34:31-53
- BEADLE, G.W.; EPHRUSSI, B. 1937. Development of eye color in *Drosophila*: diffusible substances and their interrelation. *Genetics*, 22:76-86
- BEADLE, G.W.; TATUM, E.L. 1941. Genetic control of biochemical reactions in *Neurospora*. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 27:499-506
- BENACERRAF, B.; MCDEVITT, H.O. 1972. Histocompatibility-linked immune response genes. *Science*, 175:273-279
- BERGET, S.M.; MOORE, C.M.; SHARP, P.A. 1977. Spliced segments at the 5' terminus of adenovirus 2 late mRNA. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 74:3171-3175
- BERNARD, O.; HOZUMI, N.; TONEGAWA, S. 1978. Sequences of mouse immunoglobulin light chain genes before and after somatic changes. *Cell*, 15:1133-1144

- BERNSTEIN, E.; CAUDY, A.A.; HAMMOND, S.M.; HANNON, G.J. 2001. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, 409:363-366
- BISHOP, J.M. 1981. Enemies within: the genesis of retrovirus oncogenes. *Cell*, 23:5-6
- BISHOP, J.M. 1982. Oncogenes. *Scient. Amer.*, 246(3):68-78
- BLACKBURN, E.H. 1991a. Structure and function of telomeres. *Nature*, 350:569-573
- BLACKBURN, E.H. 1991b. Telomeres. *Trends in Biochemistry*, 16:378-381
- BLACKBURN, E.H. 1992. Telomerases. *Ann. Rev. Biochem.*, 61:113-129
- BLACKBURN, E.H.; SZOSTAK, J.W. 1984. The molecular structure of centromeres and telomeres. *Ann. Rev. Biochem.*, 52:163-194
- BLAHA, G.; STANLEY, R.E.; STEITZ, T.A. 2009. Formation of the first peptide bond: the structure of EF-P bound to the 70S ribosome. *Science*, 325:966-970
- BLASCO, M.A.; LEE, H.W.; HANDE, M.P.; SAMPER, E.; LANSDORP, P.M.; DePINHO, R.A.; GREIDER, C.W. 1997. Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA. *Cell*, 91:25-34
- BOSHART, M.; GISSMANN, L.; IKENBERG, H.; KLEINHEINZ, A.; SC HEURLEN, W.; zur HAUSEN, H. 1984. A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsias and in cell derived from cervical cancer. *EMBO J.*, 3:1151-1157
- BOVERI, T. 1902. Über mehrpolige Mitosen als Mittel zur Analyse des Zellkerns. *Verh. phys.- med. Gessellsc.*, 35:67-90
- BRADLEY, A.; EVANS, M.J.; KAUFMAN, M.H.; ROBERTSON, E.1984. Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature*, 309:255-256
- BRENNAND, K.J.; SIMONE, A.; JOU, J.; GELBOIN-BURKHART, C.; TRAN, N.; SANGER, S. et al. 2011. Modelling squizizophrenia using human induced pluripotent stem cells. *Nature*, 473 :221-225
- BRENNER, S. 1974. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 77:71-94
- BRENNER, S.; JACOB, F.; MESELSON, M. 1961. An unstable intermediate carrying information from genes to ribosomes for protein synthesis. *Nature*, 190:576-580
- BRIDGES, C.B. 1916. Non disjunction as a proof of the chromosome theory of heredity. *Genetics*, 1:1-52, 107-163
- BRIGGS, R.; KING, T.J. 1952. Transplantation of living nuclei from blastula cells into enucleated frog eggs. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 38:455-463
- BRIGGS, R.; KING, T.J. 1953. Factors affecting the tranplantibility of nuclei of frog embryonic cells. *J. exp. Zool.*, 122:485-506
- BRIGGS, R.; KING, T.J. 1960. Nuclear transplantation studies on the early gastrula (*Rana pipiens*). I. Nuclei of presumptive endoderm. *Devel. Biol.*, 2: 252-270

- BRUTLAG, D.; KORNBERG, A. 1972. Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid. 36. A proofreading function for the 3' leads to 5' exonuclease activity in deoxyribonucleic acid polymerases. *J. Biol. Chem.*, 247:241-248
- BUCK, L.; AXEL, R. 1991. A novel multigene family may encode odorant receptors: A molecular basis for odor recognition. *Cell*, 65:175-187
- BUKHARI, A.I.; SHAPIRO, J.A.; ADHYA, S.L. (eds.). 1977. DNA insertion elements, plasmids and episomes. *Cold Spring Harbor Laboratory, New York*, XIII+782 pp.
- BURNET, F.M. 1959. The clonal selection theory of acquired immunity. *Vanderbilt University Press, Nashville*
- BUTLER, P.J.G.; KLUG, A. 1971. Assembly of the particle of tobacco mosaic virus from RNA and disk proteins. *Nature New Biology*, 229:47-50
- BUTLER, P.J.G.; KLUG, A. 1978. The assembly of a virus. *Scient. Amer.*, 239(5):52-59
- BYRNE J.A.; PEDERSEN, D.A.; CLEPPER, L.L.; NELSON, M.; SANGER, W.G.; GOKHALE, S.; WOLF, D.P.; MITALIPOV, S.M. 2007. Producing primate embryonic stem cells by somatic cell nuclear transfer. *Nature* doi:10.1038/nature 06357
- CAMPBELL A. 1993. Barbara McClintock. *Ann. Rev. Genet.*, 27:1-6
- CAPECCHI, M.R. 2001. Generating mice with targeted mutations. *Nat. Med.*, 7:1086-1090
- CAREY, B.W.; MARKOULAKI, S.; HANNA, J.; SAHA, K.; GAO, Q.; MITALIPOVA, M.; JAENISCH, R. 2009. Reprogramming of murine and human and somatic cells using a single polycistronic vector. *Proc Nat Acad Sci*, 106:157-162
- CDC TASK FORCE ON KAPOSÍ'S SARCOMA AND OPPORTUNISTIC INFECTIONS. 1982. Epidemiologic aspects of the current outbreak of Kaposi's sarcoma and opportunistic infections. *N. Engl. J. Med.*, 306:248-252
- CECH, T.R.; ZAUG, A.J.; GRABOWSKI, P.I. 1981. In vitro splicing of the ribosomal RNA precursor of *Tetrahymena*: involvement of a guanosine nucleotide in the excision of the intervening sequence. *Cell*, 27:487-496
- CHALFIE, M. et al. 1993. A new method of looking at *C. elegans* gene expression. *Worm Breeder's Gazette*, 13 (1) (October 1)
- CHALFIE, M.; TU, Y.; EUSKIRCHEN, G.; WARD, W.W.; PRASHER, D.C. 1994. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*, 263:802-805
- CHAMBERS, I.; COLBY, D.; RFOBERTSON, M.; NICHOLS, J.; LEE, S.; TWEEDIE, S. et al. 2003. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell*, 113:643-655
- CHAMPNESS, J.N.; BLOOMER, A.C.; BRICOGNE, G.; BUTLER, P.J.G.; KLUG, A. 1976. The structure of the protein disk of tobacco mosaic virus to 5 Å resolution. *Nature*, 259:20-24

- CHANG, M.C. 1959. Fertilization of rabbit ova in vitro. *Nature*,184:466-467
- CHARGAFF, E. 1950. Chemical specificity of nucleic acids and mechanism of their enzymatic degradation. *Experientia*, 6:201-209
- CHARGAFF, E. 1974. Building the tower of Babel. *Nature*, 248:776-779
- CHEN, I.A.; ROBERTS, R.W.; SZOSTAK, J.W. 2004. The emergence of competition between model protocells. *Science*, 305:1474-1476
- CHOW, L.T.; GELINAS, R.E.; BROKER, T.R.; ROBERTS, R.J. 1977. An amazing sequence arrangement at the 5' ends of adenovirus 2 messenger RNA. *Cell*, 12:1-8
- CIBELLI, J.B.; KIESSLING, A.A.; CUNNIFF, K.; RICHARDS, C.; LANZA, R.P.; WEST, M.D. 2001. Somatic cell nuclear transfer in humans: Pronuclear and early embryonic development. *E-biomed: The Journal of Regenerative Medicine*, 2:25-31. (<http://www.liebertpub.com/ebi>)
- CIBELLI, J.B.; LANZA, R.P.; WEST, M.D.; EZZELL, C. 2002. The first human cloned embryo. *Scient. Amer.*, 286(1):42-49
- CLARKE, L.L.; GRUBB, B.R.; GABRIEL, S.E.; SMITHIES, O.; KOLLER, B.H.; BOUCHER, R.C. 1992. Defective epithelial chloride transport in a gene-targeted mouse model of cystic fibrosis. *Science*, 257:1125-1128
- CLEMONS, W.M. Jr; MAY, J.L.; WIMBERLY, B.T.; McCUTCHEON, J.P.; CAPEL, M.S.; RAMAKRISHNAN, V. 1999. Structure of a bacterial 30S ribosomal subunit at 5.5 Å resolution. *Nature*, 400:833-840.
- COFFIN, J.; HAASE, A.; LEVY, J.A.; MONTAGNIER, L.; TEMIN, H.M. ; VARMUS, H.J. 1986. What to call the AIDS virus? *Nature*, 321:10-12
- COLD SPRING HARBOR SYMPOSIA ON QUANTITATIVE BIOLOGY. 1980. Movable genetic elements. Volume 45 (part 1, XX+445 pp.; part 2, XII+446-1025 pp.), *Cold Spring Harbor Laboratory, New York*
- CORRENS, C. 1900. G. Mendel's Regel über das Verhalten der Nachkommenschaft der Rassenbastarde. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft*, 18:158-168
- CRAMER, P.; BUSHNELL, D.A.; KORNBERG, R.D. 2001. Structural basis of transcription: RNA polymerase II at 2.8 Ångstrom resolution. *Science*, 292:1863-1876
- CREIGHTON, H.B.; MCCLINTOCK, B. 1931. A correlation of cytological and genetical crossing-over in *Zea mays*. *Proc. Nat. Acad. Sci.*,17:492-497
- CRICK, F.H.C. 1958. On protein synthesis. *Symp. Soc. Exp. Biol.*, 12:138-163
- CRICK, F.H.C. 1966. Codon-anticodon pairing: the wobble hypothesis. *J. Mol. Biol.*, 19:548-555
- CRICK, F.H.C. 1970. Central dogma of Molecular Biology. *Nature*, 227:561-563
- CRICK, F.H.C. 1974. The double helix: a personal view. *Nature*, 248:766-771
- CRICK, F.H.C. 1981. Life Itself. *Simon & Schuster*

- CRICK, F.H.C. 1988. What mad pursuit. (Traducida al castellano con el título “Qué loco propósito. Una visión personal del descubrimiento científico”, *Tusquets Editores, S.A., Barcelona*, 1989)
- CRICK, F.H.C. 1990. The astonishing hypothesis. *The Francis H.C.Crick and Odile Crick Revocable Trust* (Traducido al castellano con el título “La búsqueda científica del alma. Una revolucionaria hipótesis para el siglo XXI”. *Cículo de Lectores, S.A. Barcelona*, 1994)
- CRICK, F.H.C.; BARNETT, L.; BRENNER, S.; WATTS-TOBIN, R.J. 1961. General nature of the genetic code for proteins. *Nature*, 192:1227-1232
- CRICK, F.H.C.; KLUG, A. 1975. Kinky helix. *Nature*, 225:530-533
- CUENOD, B.; SZOSTAK, J.W. 1995. A DNA metalloenzyme with DNA ligase activity. *Nature*, 375:611-614
- CUENOT, L. 1902. La loi de Mendel et l'heredité de la pigmentation chez les souris. *Arch. Zool. exp. gén., 3^{eme} serie, Notes et Revue*, 27-30
- DANEHOLT, B. 2006. RNA interference. *The Nobel Assembly at Karolinska Institutet, Oficial website Nobel Foundation*
- DANNA, K.J.; SACK, G.H.; NATHANS, D. 1973. Studies of simian virus 40 DNA. VII. A cleavage map of the SV40 genome. *J. Mol. Biol.*, 78:363-376
- DAUSSET, J. 1958. Iso-leuco-anticorps. *Acta Haematol.*, 20:156-166
- DAUSSET, J.; COLOMBANI, J.; LEGRAND, L., FEINGOLD, N. 1968. Le deuxième sub-locus du système HL-A. *Nouv. Rev. Franc. Haematol.*, 8:861
- DAUSSET, J.; RAPAPORT, F.T.; IVANYI, P.; COLOMBANI, J. 1965. Tissue allo-antigens and transplantation. *Histocompatibility testing 1965, Munksgaard, Copenhagen*, pp. 63-69
- DAUSSET, J.; WALFORD, R.L.; COLOMBANI, J.; LEGRAND, L., FEINGOLD, N., RAPAPORT, F.T. 1969. The HL-A sub-loci and their importance in transplantation. *Transplant. Proc.*, 1:331
- DELBRÜCK, M., BAILEY, W.T. 1946. Induced mutations in bacterial viruses. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 11:33-37
- DI BERARDINO, M.A.; HOFFNER, N.J. 1980. The current status of cloning and nuclear reprogramming in amphibian eggs. En *Differentiation and Neoplasia (Results and Problems in Cell Differentiation, vol. 11)* (edited by R.G. McKinell; M.A. Di Berardino; M. Blumenfeld; R.D. Bergard), *Springer Verlag*, pp.53-64
- DI BERARDINO, M.A.; KING, J.T. 1967. Development and cellular differentiation of neural nuclear transplants of known karyotype. *Devel. Biol.*, 15:102-128
- DIANOV, G.; LINDAHL, T. 1994. Reconstitution of the DNA base excision-repair pathway. *Curr. Biol.*, 4:1069-1076
- DIMOS, J.T.; RODOLFA, K.T.; NIAKAN, K.K.; WEISENTHAL, L.M.; MITSUMOTO, H.; CHUNG, W.; CROFT, G.F.; SAPHIER, G.; LEIBEL, R.; GOLAND, R.; WICHTERL, H.; HENDERSON, E-CE.; EGGAN, K. 2008. Induced

- pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science*, 321:1218-1221
- DOBZHANSKY, T. 1973. Nothing in biology makes sense except in the light of evolution. *Amer. Biol. Teacher*, 35:125-129
- DOETSCHMAN, T.; GREGG, R.G.; MAEDA, N.; HOOPER, M.L.; MELTON, D.W.; THOMPSON, S.; SMITHIES, O. 1987. Targeted correction of a mutant HPRT gene in mouse embryonic stem cells. *Nature*, 330:576-578
- DOUDNA, J.A.; SZOSTAK, J.W. 1989. RNA-catalysed synthesis of complementary-strand RNA. *Nature*, 339:519-522
- DREYER, W.J.; BENNETT, J.C. 1965. The molecular basis of antibody formation: A paradox. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 54:864
- DUBOULE, D.; MORATA, G. 1994. Colinearity and functional hierarchy among genes of the homeotic complexes. *Trends in Genetics*, 10:358-364
- DURST, M.; GISSMANN, L.; IKENBERG, H.; zur HAUSEN, H. 1983. A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. *PNAS*, 80:560-563
- EBERT, A.D.; YU, J.; ROSE Jr, F.F.; MATTIS, V.B.; LORSON, C.L.; THOMSON, J.A.; SVENDSEN, C.N. 2009. Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient. *Nature*, 457:277-281
- EDELMAN, G.M. 1959. Dissociation of γ globulin. *J. Am. Chem. Soc.*, 81:3155
- EDELMAN, G.M. 1994. The evolution of somatic selection: The antibody tale. *Genetics*, 138:975-981
- EDELMAN, G.M.; CUNNINGHAM, B.A.; GALL, W.E.; GOTTLIER, P.D.; RUTISHAUSER, U.; WAXDEL, M.J. 1969. The covalent structure on an entire γ G-immunoglobulin molecule. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 63:78-85
- EDWARDS, R.G. 1965a. Maturation in vitro of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey and human ovarian oocytes. *Nature*, 208:349-351
- EDWARDS, R.G. 1965b. Maturation in vitro of human ovarian oocytes. *The Lancet*, 2:926-929
- EDWARDS, R.; STEPTOE, P.C. 1980. A matter of life, *Hutchinson & Co. (Publishers) Ltd., London (traducido al español por J. Adsuar, "Cuestión de vida", Editorial Argos Vergara, S.A., Barcelona, 1980)*
- EDWARDS, R.G.; STEPTOE, P.C.; PURDY, J.M. 1970. Fertilization and cleavage in vitro of preovulator human oocytes. *Nature*, 227:1307-1309
- EGGAN, K.; BALWIN, K.; TACKETT, M.; OSBORNE, J.; CHESS, A.; AXEL, R.; JAENISCH, R. 2004. Mice cloned from olfactory sensory neurons. *Nature*, 428:44-49
- EHRENBERG, M. 2008. The green fluorescent protein: discovery, expression and development. Information Department, The Royal Swedish Academy of Sciences

- EHRENBERG, M. 2009. Structure and function of the ribosome, *Scientific Background on the Nobel Prize in Chemistry 2009, The Royal Swedish Academy of Sciences*, 22 pp.
- ELLIS, E.L., DELBRÜCK, M. 1939. The growth of bacteriophage. *J. Gen. Physiol.*, 22:365-384
- ELLIS, H.M. ; HORVITZ, H.R. 1986. Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell*, 44:817-829
- ELSDALE, T.R.; FISCHBERG, M.; SMITH, S. 1958. A mutation that reduces nucleolar number in *Xenopus laevis*. *Exp. Cell Res.*, 14:642-643
- EVANS, M.J.; KAUFMAN, M.H. 1981. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 292:154-156
- EVANS, T.; ROSENTHAL, E.T.; YOUNGBLOM, J.; DISTEL, D.; HUNT, T. 1983. Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell*, 33:389-396
- FEDOROFF, N.V. 1983. Controlling elements in maize. En *Mobile genetic elements* (ed. J.A. Shapiro), *Academic Press, New York*, pp. 1-63
- FEDOROFF, N.V. 1984. Transposable genetic elements in maize. *Scient. Amer.*, 250(6):64-74
- FEDOROFF, N.V. 1994. Barbara McClintock (June 16,1902-September 2,1992). *Genetics*, 136:1-10
- FINCH, J.T.; KLUG, A. 1976. Solenoidal model for superstructure in chromatin. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 73:1897-1901
- FINCH, J.T.; LUTTER, L.C.; RHODES, D.; BROWN, R.S.; RUSHTON, B.; LEVIT, M.; KLUG, A. 1977. Structure of nucleosome core particles of chromatin. *Nature*, 269:29-36
- FIRE, A.; XU, S.Q.; MONTGOMERY, M.K.; KOSTAS, S.A.; DRIVER, S.E.; MELLO, C.C. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391:806-811
- FLEMMING, W. 1882. Zellsubstanz, Kern und Zellteilung. *Vogel, Leipzig*
- FOLGER, K.R.; WONG, E.A.; WAHL, G.; CAPECCHI, M.R. 1982. Patterns of integration of DNA microinjected in cultured mammalian cells: Evidence for homologous recombination between injected plasmid DNA molecules. *Mol. Cell Biol.*, 2:1372-1387
- FORD, M. 2008. Science magazine's top 10 breakthroughs of the year. *Science*
- FRANKLIN, R.E.; GOSLING, R.G. 1953. Molecular configuration in sodium thymonucleate. *Nature*, 171:740-741
- FRISÉN, J.; LENDAHL, U.; PERIMANN, T. 2012. Mature cells can be reprogrammed to become pluripotent. *The 2012 Nobel Prize in Physiology or Medicine – Advanced Information*. <http://Nobelprize.org>
- GALLO, R.C. 1971. Reverse transcriptase, the DNA polymerase of oncogenic RNA viruses. *Nature*, 234:194-198
- GALLO, R.C.; POPOVIC, M.; et al. 1983. Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*, 220:865-867

- GALLO, R.C.; SALAHUDDIN, S.Z.; POPOVIC, N.; et al. 1984. Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science*, 224:500-503
- GAMOW, G. 1954. Possible relation between deoxyribonucleic acid and protein structure. *Nature*, 173:318
- GARCÍA-BELLIDO, A. 1972. Pattern formulation in imaginal disks. En *The biology of imaginal disks* (eds. H.Ursprung and R.Nöthiger), *Springer-Verlag, Berlin*, pp. 59-86
- GARROD, A.E. 1909. Inborn errors of metabolism. *Oxford University Press, London*
- GILBERT, S.F. 2000. Developmental biology (Sixth edition). *Sinauer Associates, Inc. Publ., Sunderland, Ma.*
- GILLAM, S.; JAHNKE, P.; ASTELL, C.; PHILLIPS, S.; HUTCHISON, C.A. III; SMITH, M. 1979. Defined transversion mutations at a specific position using synthetic oligodeoxyribonucleotides as mutagens. *Nucleic Acids Res.*, 6:2973-2985
- GILLAM, S.; SMITH, M. 1979a. Site-specific mutagenesis using synthetic oligodeoxyribonucleotide primers: I. Optimum conditions and minimum oligodeoxyribonucleotide length. *Gene*, 8:81-97
- GILLAM, S.; SMITH, M. 1979b. Site-specific mutagenesis using synthetic oligodeoxyribonucleotide primers: II. In vitro selection of mutant DNA. *Gene*, 88:99-106
- GISSMANN, L.; zur HAUSEN, H. 1976. Human papilloma virus DNA: physical mapping and genetic heterogeneity. *PNAS*, 73:1310-1313
- GLASS, B. 1965. A century of biochemical genetics. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 109:227-236
- GLICKMAN, B.W.; RADMAN, M. 1980. *Escherichia coli* mutator mutants deficient in methylation-instructed DNA mismatch corrections. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 77:1063-1067
- GNATT, A.L.; CRAMER, P.; FU, J.; BUSHNELL, D.A.; KORNBERG, R.D. 2001. Structural basis of transcription: An RNA polymerase II elongation complex at 3.3 Å resolution. *Science*, 292:1876-1882
- GREEN, D.R.; REED, J.C. 1998. Mitochondria y Apoptosis. *Science*, 281:1309-1312
- GREIDER, C.W. 1990. Telomeres, telomerase and senescence. *BioEssays*, 12:363
- GREIDER, C.W. 1993. Telomerase and telomerase-length regulation: Lessons from small eukaryotes to mammals. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 58:719-723
- GREIDER, C.W.; BLACKBURN, E.H. (1985): Identification of a specific telomere terminal transferase activity in *Tetrahymena* extracts. *Cell*, 43:405-413.
- GREIDER, C.W.; BLACKBURN, E.H. (1987): The telomere terminal transferase of *Tetrahymena* is a ribonucleoprotein enzyme with two kinds of primer specificity. *Cell*, 51:887-898.
- GREIDER, C.W.; BLACKBURN, E.H. (1989): A telomeric sequence in the RNA of *Tetrahymena* telomerase required for telomere repeat synthesis. *Nature*, 337:331-337.
- GRIFFITH, F. 1928. Significance of pneumococcal types. *J. Hyg. Camb.*, 27:113-159

- GROSS, L.A.; BAIRD, G.S.; HOFFMAN, R.C.; BALDRIDGE, K.K.; TSIEN, R.Y. 2000. The structure of the chromophore within DsRed, a red fluorescent protein from coral. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 97:11990-11995
- GRUNBERG-MANAGO, M.; OCHOA, S. 1955. Enzymatic synthesis and breakdown of polynucleotides: Polynucleotide phosphorylase. *J. Am. Chem. Soc.*, 77:3165-3166
- GUERRIER-TAKADA, C.; GARDINER, K.; MARSH, T.; PACE, N.; ALTMAN, S. 1983. The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme. *Cell*, 35:849-857
- GURA, T. 2001. Eyes on the prize. *Nature*, 413:560-564
- GURDON, J.B. 1962. Adult frogs derived from the nuclei of single somatic cells. *Devel. Biol.*, 4:256-273
- GURDON, J.B.; MELTON, D.A. 2008. Nuclear reprogramming in cells. *Science*, 322:1811-1815
- GUSTAFSSON, C.M. 2015. Mechanistic studies of DNA repair. *The Royal Swedish Academy of Sciences*
- GUYER, R.L.; KOSHLAND, D.E. 1989. The molecule of the year. *Science*, 246:1543-1544
- HADORN, E. 1963. Genetics on its way. *Proc. XI Int. Cong. Genet., The Hague.*
- HADORN, E. 1965. Problems of determination and transdetermination. *Brookhaven Symp. Biol.* No. 18 (*Genetic control of differentiation*), pp. 148-161
- HAMMOND, S.M. 2005. Dicing and slicing. The core machinery of the RNA interference pathway. *FEBS Letter*, 579:5822-5829
- HAMMOND, S.M.; BERNSTEIN, E.; BEACH, D.; HANNON, G.J. 2000. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature*, 404:293-296
- HANCZYC, M.M.; FUJIKAWA, S.M.; SZOSTAK, J.W. 2003. Experimental models of primitive division. *Science*, 302:618-622
- HANNA, J.; WERNING, M.; MARKOULAKI, S.; SUN, CH-W.; MEISSNER, A.; CASSADI, J.P.; BEARD, C.; BRAMBRINKT, T.; WU, L-CH.; TOWNES, T.M.; JAENISCH, R. 2007. Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin. *Science*, 318:1920-1923
- HANNON, G.J. 2002. RNA interference. *Nature*, 418:244-251
- HANSSON, G.K. 2007. Gene modification in mice. *Advanced information, The Nobel Assembly at Karolinska Institutet, página web Nobelprize.org*
- HARMS, J.; SCHLUENZEN, F.; ZARIVACH, R.; BASHAN, A.; GAT, S.; AGMON, I.; BARTELS, H.; FRANCESCHI, F.; YONATH, A. 2001. High resolution structure of the large ribosomal subunit from a mesophilic eubacterium. *Cell*, 107:679-688
- HARTWELL, L.H.; KASTAN, M.B. 1994. Cell cycle control and cancer. *Science*, 266:1821-1828
- HARTWELL, L.H.; WEINERT, T.A. 1989. Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science*, 246:629-634

- zur HAUSEN, H.; MEINHOF, W.; SCHEIBER, W.; BORNKAMM, G.W. 1974. Attempts to detect virus-specific DNA in human tumors. I. Nucleic acid hybridizations with complementary RNA of human wart virus. *Int. J. Cancer*, 13:650-656
- HEIM, R.; CUBITT, A.; TSIEN, R.Y. 1995. Improved green fluorescence. *Nature*, 373:663-664
- HEIM, R.; PRASHER, D.C.; TSIEN, R.Y. 1994. Wavelength mutations and posttransductional autooxidation of green fluorescent protein. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 91:12501-12504
- HEIM, R.; TSIEN, R.Y. 1996. Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelengths and fluorescence resonance energy transfer. *Curr. Biol.*, 6:178-182.
- HENGARTNER, M.O. 2000. The biochemistry of apoptosis. *Nature*, 407:770-776
- HERSHEY, A.D. 1946. Spontaneous mutations in bacterial viruses. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 11:67-77
- HERSHEY, A.D.; CHASE, M. 1952. Independent functions of viral protein and nucleic acid in growth of bacteriophage. *J. Gen. Physiol.*, 36:39-56
- HERSHEY, A.D.; ROTMAN, R. 1949. Genetic recombination between host range and plaque-type mutants of bacteriophage in single bacterial cells. *Genetics*, 34:44-71
- HOCHEDLINGER, K. 2010. El poder terapéutico de nuestras células. *Investigación y Ciencia* (julio 2010):24-31.
- HOCHEDLINGER, K.; PLATH, K. 2009. Epigenetic reprogramming and induced pluripotency. *Development*, 136:509-523
- HOLLEY, R.W.; APGAR, J.; EVERETT, G.A.; MADISON, J.T.; MARQUISEE, M., MERRILL, S.H.; PENSWICK, J.R.; ZAMIR, A. 1965a. Structure of a ribonucleic acid. *Science*, 147:1462-1465
- HOLLEY, R.W.; EVERETT, G.A.; MADISON, J.T.; ZAMIR, A. 1965b. Nucleotide sequences in the yeast alanine transfer ribonucleic acid. *J. Biol. Chem.*, 240:2122-2128
- HOLLIDAY, R. 1964. A mechanism for gene conversion in fungi. *Genet. Res.*, 5:282-304
- HOOPER, M.; HARDY, K.; HANDYSIDE, A.; HUBNER, S.; MONK, M. 1987. HPRT-deficient (Lesch-Nyhan) mouse embryos derived from germline colonization by cultured cells. *Nature*, 326:292-295
- HORVITZ, H.R.; ELLIS, H.M.; STERNBERG, P.W. 1982. Programmed cell death in nematode development. *Neurosci. Commentaries*, 1:56-65
- HOWARD-FLANDERS, P.; BOYCE, R.P.; THERIOT, L. 1966. Three loci in *Escherichia coli* K-12 that control the excision of pyrimidine dimers and certain other mutagen products from DNA. *Genetics*; 53:1119-1136
- HOZUMI, N.; TONEGAWA, S. 1976. Evidence for somatic rearrangement of immunoglobulin genes coding for variable and constant regions. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 73:3628-3632

- HUANGFU, D.; OSAFUNE, K.; MAEHR, R.; GO, W.; EIJKELENBOOM, A.; CHEN, S.; MUHLESTEIN, W.; MELTON, D.A. 2008. Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2. *Nature Biotechnology*, 26:1269-1275
- HUEBNER, R.J.; TODARO, G.J. 1969. Oncogenes of RNA tumor viruses as determinants of cancer. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 64:1087
- HUTCHISON, C.A.III; PHILLIPS, S., EDGELL, M.H.; GILLAM, S.; JAHNKE, P.; SMITH, M. 1978. Mutagenesis at a specific position in a DNA sequence. *J. Biol. Chem.*, 253:6551-6560
- IEDA, M.; FU, J.D.; DELGADO-OLGUIN, P.; VEDANTHAM, V.; HAYASHI, Y.; BRUNEAU, B.G. *et al.*; 2010. Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors. *Cell*, 142:375-386
- INGRAM, V.M. 1956. A specific chemical difference between the globins of normal and sickle-cell anaemia haemoglobin. *Nature*, 178:792-794
- INNIS, M.A.; MYAMBO, K.B.; GELFAND, D.H., BROW, M.A.D. 1988. DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 85:9436-9440
- ISRAEL, M.A.; YUAN, S.H.; BARDY, C.; REYNA, S.M.; MU, Y.; HERRERA, C. *et al.* 2012. Probing sporadic and familial Alzheimer's disease using induced pluripotent stem cells. *Nature*, 482:216-220
- IZPISÚA BELMONTE, J.C.; ELLIS, J.; HOCHEDLINGER, K.; YAMANAKA, S. 2009. Induced pluripotent stem cells and reprogramming: seeing the science through the hype. *Nature Reviews Genetics*, 10:878-883.
- JACKSON, D.A.; SYMONS, R.H.; BERG, P. 1972. Biochemical method for inserting new genetic information into DNA of simian virus 40: Circular SV40 DNA molecules containing lambda phage genes and the galactose operon of *Escherichia coli*. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 69:2904-2909
- JACOB, F. 1970. La logique du vivant. Une histoire de l'hérédité. *Editions Gallimard*, 354 pp.
- JACOB, F. 1987. La statue intérieure. *Editions Odile Jacob* (traducida al castellano con el título "La estatua interior", *Tusquets Editores, S.A., Barcelona*, 1989)
- JACOB, F.; MONOD, J. 1961a. Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J. Mol. Biol.*, 3:318-356
- JACOB, F.; MONOD, J. 1961b. On the regulation of gene activity. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 26:193-211
- JACOB, F.; PERRIN, D., SANCHEZ, C.; MONOD, J. 1960. L'operon groupe des gènes à expression coordonnée par un opérateur. *Compt. Rend. Acad. Sci.*, 250:1727
- JOYCE, G.F. 1989. RNA evolution and the origins of life. *Nature*, 338:217-224
- KAHMANN, R. 1992. Barbara McClintock - a personal view. *Trends in Genetics*, 8:407
- KAISER, C.A.; SCHECKMAN, R. 1990. Distinct sets of *SEC* genes govern transport vesicle formation and fusion early in the secretory pathway. *Cell*, 61:723-733

- KELLER, E.F. 1983. A feeling for the organism: The life and work of Barbara McClintock. *W.H. Freeman and Company, New York*, 235 pp. (traducida al castellano con el título "Seducida por lo vivo. Vida y obra de Barbara McClintock", *Editorial Fontalba, S.A., Barcelona*, 1984)
- KELNER, A. 1949. Photoreactivation of Ultraviolet-Irradiated Escherichia Coli, with Special reference to de Dose-Reduction Principle and to Ultraviolet-Induced Mutation. *J. Bacteriol.*, 58:511-522
- KENNEDY, D. 2007. Editorial. Breakthrough of the year. *Science*, 318:1833. FORD, M. 2008. Science magazine's top 10 breakthroughs of the year. *Science*
- KERR, J.F.; WYLLIE, A.H.; CURRIE, A.R. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br.J.Cancer*, 26:239-257
- KHORANA, H.G. 1965. Polynucleotide synthesis and the genetic code. *Federation Proc.*, 24:1473-1487
- KIM, J.B.; SEBASTIANO, V.; WU, G.; ARAÚZO-BRAVO, M.J.; SASSE, P.; GENTILE, L.; KO, K.; RUAU, D.; EHRICH, M.; van den BOOM, D.; MEYER, J.; HÜBNER, K.; BERNEMANN, C.; ORTMEIER, C.; ZENKE, M.; FLEISCHMANN, B.K.; ZAEHRES, H.; SCHÖLER, H.R. 2009. Oct4-induced pluripotency in adult neural stem cells. *Cell*, 136:411-419
- KING, T.J.; BRIGGS, R. 1955. Changes in the nuclei of differentiating gastrula cells, as demonstrated by nuclear transplantation. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 41:321-325.
- KLUG, A. 1974. Rosalind Franklin and the double helix. *Nature*, 248:787-788
- KLUG, A.; FINCH, J.T.; RICHMOND, T.J. 1985. Cristallographic structure of the octamer histone core of the nucleosome. *Science*, 229:1109-1110
- KLUG, A.; RHODES, D.; SMITH, J.; FINCH, J.T.; THOMAS, J.O. 1980. A low resolution for the histone core of the nucleosome. *Nature*, 287:509-516
- KOBEL, H.R.; BRUN, R.B.; FISCHBERG, M. 1973. Nuclear transplantation with melanophores, ciliated epidermal cells, and the established cell line A-8 in *Xenopus laevis*. *J. Embryol. Exp. Morphol.*, 29:539-547
- KOCH, P.; BREUER, P.; PEITZ, M.; JUNGVERDORBEN, J.; KESAVAN, J.; POPPE, D. et al. 2011. Excitation-induced ataxin-3 aggregation in neurons from patients with Machado-Joseph disease. *Nature*, 480:543-546
- KÖHLER, G.; MILSTEIN, C. 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256:495-497
- KÖHLER, G.; MILSTEIN, C. 1976. Derivations of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion. *Eur. J. Immunol.*, 6:511-519
- KORNBERG, A. 1960. Biological synthesis of deoxyribonucleic acid. *Science*, 131:1503-1508
- KORNBERG, A. 1969. Active center of DNA polymerase. *Science*, 163:1410-1418
- KORNBERG, A. 1978. Aspects of DNA replication. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 43:1-9

- KORNBERG, A. 1980. DNA replication. *W.H. Freeman and Company, San Francisco*, X+724pp.
- KORNBERG, A.; LEHMAN, I.R.; BESSMAN, M.J., SIMMS, E.S. 1956. Enzymic synthesis of deoxyribonucleic acid. *Biochim. Biophys. Acta*, 21:197-198
- KORNBERG, R.D. 1974. Chromatin structure: a repeating unit of histone and DNA. *Science*, 184:868-871
- KORNBERG, R.D.; THOMAS, J.O. 1974. Chromatin structure; oligomers of the histones. *Science*, 184:865-868
- KOROSTELEV, A.; ASAHARA, H.; LANCASTER, L.; LAURBERG, M.; HIRSCHI, A.; ZHU, J.; TRAKHANOV, S.; SCOTT, W.G.; NOLLER, H.F. 2008. Cristal structure of a translation termination complex formed with release factor RF2. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 105:19684-19689
- KOSSEL, A. 1893-1894. Über die Nucleinsäure. *Archiv für Anatomy und Physiologie. Physiologie Abteilung*, 1893:157-164, 1894:194-203
- KRUGER, K.; GRABOWSKI, P.J., ZAU, A.J.; SANDS, J.; GOTTSCHLING, D.E.; CECH, T.R. 1982. Self-splicing RNA: Autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of *Tetrahymena*. *Cell*, 31:147-157
- KRUMLAUF, R. 1994. *Hox* genes in vertebrate development. *Cell*, 78:191-201
- KUBOTA, Y. et al. 1996. Reconstitution of DNA base excision-repair with purified human proteins: interaction between DNA polymerase beta and the XRCC1 protein. *EMBO J.*; 15:6662-6670
- LACADENA, J.R. 1969. Microsporogenesis in alloplasmic rye. *Wheat Information Service*, 29:21-22
- LACADENA, J.R. 1970. Genética Vegetal. Fundamentos de su aplicación. *A.G.E.S.A., Madrid*, 429 pp.
- LACADENA, J.R. 1974. Introducción a la Genética: Una perspectiva histórica. *Ser. Monogr. Dpto. Genética, Fac. Biol., Univ. Complutense de Madrid*, vol. 1, 38 pp.
- LACADENA, J.R. 1976. El medio ambiente: Problemas genéticos. *Rev. Univ. Complutense*, 105:131-164
- LACADENA, J.R. 1981. Genética (3ª edición), *A.G.E.S.A., Madrid*
- LACADENA, J.R. 1984a. Una perspectiva histórico-conceptual de la Genética. En *En el centenario de Mendel: La Genética ayer y hoy* (coord. J.R.Lacadena), *Editorial Alhambra, S.A., Madrid*, pp. 103-165
- LACADENA, J.R. 1984b. De la teoría cromosómica de la herencia a la Citogenética moderna como modelo de ciencia experimental. En *En el centenario de Mendel: la Genética ayer y hoy* (coord. J.R.Lacadena), *Editorial Alhambra, S.A., Madrid*, pp. 167-188
- LACADENA, J.R. 1984c. Mendel, ese desconocido. *Arbor*, tomo CXVII, mim. 459:7-37
- LACADENA, J.R. 1985. La historia de la Genética a través de la Bioquímica. En *Historia de la Bioquímica* (coord. A.M.Municio), *Real Acad. Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Madrid*, pp. 157-172
- LACADENA, J.R. 1986. La Genética: Una narrativa histórico-conceptual. *Editorial Alhambra, S.A., Madrid*, 171 pp.

- LACADENA, J.R. 1988a. Genética (4ª edición). *A.G.E.S.A., Madrid*, XXXII+1549 pp.
- LACADENA, J.R. 1988b. Manipulación genética. En *Dilemas éticos de la Medicina actual. 2. Fundamentos de la bioética y manipulación genética* (ed. J.Gafo), *Publ. Univ. Pontificia Comillas, Madrid*, pp. 133-176
- LACADENA, J.R. 1990. El ADN, la molécula de doble filo. *Col. Conferencias Cursos Universitarios de Verano, Univ. Santa Catalina (1550-1841), El Burgo de Osma*, 33 pp.
- LACADENA, J.R. 1991a. Problemas genéticos en relación con el medio ambiente. En *Dilemas éticos de la Medicina actual.5. Ética y ecología* (ed. J.Gafo), *Publicaciones Univ. Pontif. Comillas, Madrid*, pp. 77-118
- LACADENA J.R. 1991b. Hacia los organismos superiores: La evolución genética. En *De la nada al hombre. Una historia de nuestro origen* (ed. C.Seoane), *Biblioteca de Autores y Temas Manchegos, Diputación de Ciudad Real*, pp. 87-110
- LACADENA, J.R. 1993. El Proyecto Genoma Humano y sus derivaciones. En *Problemas éticos de la Medicina actual. 7. Ética y biotecnología* (ed. J.Gafo), *Publ. Univ. Pontificia Comillas, Madrid*, pp. 95-121
- LACADENA, J.R. 1995a. Historia “nobelada” de la Genética: Concepto y método. *Discurso de Ingreso en la Real Academia Nacional de Farmacia del Instituto de España, Madrid*, 76 pp.
- LACADENA, J.R. 1995b. Cytogenetic: yesterday, today and forever. A conceptual and historical view (Opening lecture, 12th International Chromosome Conference). *Chromosomes Today Volume 12, Chapman & Hall, London* (in press)
- LACADENA, J.R. 1995c. Consideraciones genético-biológicas sobre el desarrollo embrionario humano. En *Genética Humana, Fundamentos para el estudio de los efectos sociales derivados de los avances en genética humana* (ed. C.M. Romeo Casabona), *Universidad de Deusto, Bilbao*, pp. 77-103
- LACADENA, J.R. 1996. Citogenética. *Editorial Complutense, S.A., Madrid*, 931 pp.
- LACADENA, J.R. 1999. Genética General. Conceptos fundamentales. (Capítulo 16: Genética del desarrollo en eucariontes), *Editorial Síntesis, Madrid*
- LACADENA, J.R. 2000. Conmemorando un siglo de Genética. *Anal. R. Acad. Farm.*, 66:485-540
- LACADENA, J.R. 2001. Premios Nobel 2001: Un comentario sobre el premio de Fisiología y Medicina. *Anal. R. Acad. Farm.*, 67:502-506
- LACADENA, J.R. 2003. Crónica de una muerte anunciada: los premios Nobel en Fisiología o Medicina 2002. *Anal. R. Acad. Nac. Farmacia*, 69:28-42
- LACADENA, J.R. 2003 b. Dichos, refranes y Genética. Lección Inaugural del Curso Académico 2003/2004, Universidad Complutense.
- LACADENA, J.R. 2005. Los Premios Nobel 2004 en Fisiología o Medicina y en Química: La importancia de los olores y del “beso de la muerte”. *Anal. R Acad. Nac. Farm.*, 71: 5-14

- LACADENA, J.R. 2006. Fraudes científicos: Ética de la investigación, *Página web "Genética y Bioética", Centro Nacional de Información y Comunicación Educativa (CNICE), MEC, <http://w3.cnice.mec.es/tematicas/genetica>*
- LACADENA, J.R. 2007. Conmemorando los 100 años del término "Genética" (1905-2005): Una historia "nobelada" de la Genética. *Conferencia plenaria, Congreso de la Sociedad Española de Genética, Almería, 2005, Secretariado de Publicaciones, Universidad de León, VII+109 pp.*
- LACADENA, J.R. 2008. La tecnología *knock-out*, premio Nobel de Fisiología o Medicina 2007. *An. R. Acad. Nac. Farm.*, 74:65-79
- LACADENA, J.R. 2009. El premio Nobel de Fisiología o Medicina 2008: deshaciendo el nudo gordiano. El premio Nobel de Química 2008: otra herramienta genética al servicio de la ciencia. *An. R. Acad. Nac. Farm.*, 75:65-76
- LACADENA, J.R. 2011. Genética y Sociedad. *Sesión Inaugural del Curso de la Real Academia Nacional de Farmacia, Madrid* (13 de enero de 2011), 147 pp.
- LACADENA, J.R. 2015. El Premio Nobel 2015 en Química. La reparación del daño genético: retorno a los primeros tiempos de la Genética en la era genómica *An. R. Acad. Nac. Farm.*, 81:380-385
- LANDSTEINER, K. 1900. Zur Kenntniss der antifermentativen, lytischen und agglutinierenden Wirkungen der Blutserums und der Lymphe. *Zentralbl. für Bakteriologie*, 27:357-362
- LANDSTEINER, K. 1901. Über Agglutinationserscheinungen normalen menschlichen Blutes. *Wien. Klin. Wsch.*, 14:1132
- LANDSTEINER, K.; LEVINE, P. 1927. A new agglutinable factor differentiating individual human bloods. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. N. Y.*, 24:600-602
- LANDSTEINER, K.; WIENNER, A.S. 1940. An agglutinable factor in human blood recognized by immune sera from rhesus blood. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. N. Y.*, 43:223
- LAUE, R.S., AU, K.G.; MODRICH, P. 1989. DNA mismatch correction in a defined system. *Science*, 245:160-164
- LAURBERG, M.; ASAHARA, H.; KOROSTELEV, A.; ZHU, J.; TRAKHANOV, S.; NOLLER, H.F. 2008. Structural basis for translation termination on the 70S ribosome. *Nature*, 454:852-857
- LEDERBERG, J. 1994. The transformation of Genetics by DNA: An anniversary celebration of AVERY, MacLEOD and McCARTY (1944). *Genetics*, 136:423-426
- LEDERBERG, J.; CAVALLI, L.L.; LEDERBERG, E. 1952. Sex compatibility in *E. coli*. *Genetics*, 37:720
- LEDERBERG, J.; TATUM, E.L. 1946. Novel genotypes in mixed cultures of biochemical mutants of bacteria. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 11:113-114
- LEE, M.G.; NURSE, P. 1987. Complementation used to clone a human homologue of the fission yeast cell cycle control gene *cdc2*. *Nature*, 327:31-35

- LEE, M.G.; NURSE, P. 1988. Cell cycle genes in fission yeast and mammalian cells. *Trends in Genetics*, 4:287-290
- LEE, M.S.; GALLAGHER, R.C.; BRADLEY, J.; BLACKBURN, E.H. (1993): In vivo and in vitro studies of telomeres and telomerase. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 58:707-718.
- LEMAITRE, B.; NICOLAS, E.; MICHAUT, L.; REICHHART, J.M. ; HOFFMANN, J.A. 1996. The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in drosophila adults. *Cell*, 86:973-983.
- LEVENE, P.A. 1921. On the structure of thymus nucleic acid and on its possible bearing on the structure of plant nucleic acid. *J. Biol. Chem.*, 48:119-125
- LEVY, J.A.; HOFFMAN, A.D.; KRAMER, S.M.; LANDIS, J.A.; SHIMABUKURU, J.M.; OSHIRO, L.S. 1984. Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS. *Science*, 225:840-842
- LEWIS, E.B. 1951. Pseudoallelism and gen evolution. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 16:159-172
- LEWIS, E.B. 1964. Genetic control and regulation of developmental pathways. En *The role of chromosomes in development* (ed. M.Locke), *Academic Press, New York*, pp. 231-252
- LEWIS, E.B. 1967. Genes and gene complexes. En *Heritage from Mendel* (ed. A.Brindk), *Univ. of Wisconsin Press, Madison*, pp. 17-47
- LEWIS, E.B. 1978. A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature*, 276:565-570
- LEWIS, E.B. 1985. Regulation of the genes of the *bithorax* complex in *Drosophila*. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 50:155-164
- LEWIS, E.B. 1994. Homeosis: the first 100 years. *Trends in Genetic*, 10:341-343
- LINDAHL, T. 1974. An N-glycosidase from *Escherichia coli* that releases free uracil from DNA containing deaminated cytosine residues. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 71:3649-53
- LINDAHL, T.; NYBERG, B. 1972. Rate of depurination of native deoxyribonucleic acid. *Biochemistry*, 11:3610-3618
- LINDAHL, T.; NYBERG, B. 1974. Heat-induced deamination of cytosine residues in deoxyribonucleic acid. *Biochemistry*, 13:3405-10
- LINDEGREN, C.C. 1953. Gene conversion in *Saccharomyces*. *J. Genet.*, 51:625-637
- LIU, G-H.; BARKHO, B.Z.; RUIZ, S.; DIEP, D.; QU, J.; YANG, S-L.; PANOPOULOS, A.D.; SUZUKI, K.; KURIAN, L.; WALSH, C.; THOMPSON, J.; BOUE, S.; FUNG, H.L.; SANCHO-MARTÍNEZ, I.; ZHANG, K.; YATES, J. III; IZPISUA BELMONTE, J.C. 2011. Recapitulation of premature ageing with iPSCs from Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nature*, 2011; DOI:10.1038/nature09879
- LIU, G-H; QU, J.; SUZUKI, K.; NIVET, E.; LI, M.; MONTSERRAT, N.; YI, F. ; RUIZ, X.S. ; ZHANG, W. ; WAGNER, U.; KIM, A.; REN, B.; LI, Y.; GOEBL, A.; RUPA, J.K.; SOLIGALLA, D.; DUBOVA, I.; THOMSON, J.; YATES III, J.;

- RODRIGUEZ, G.; SANCHO-MARTÍNEZ, E.I.; IZPISUA BELMONTE, J.C. 2012. Progressive degeneration of human neural stem cells caused by pathogenic LRRK2. *Nature*, doi:10.1038/nature 11557
- LOCKSHIN, R.; WILLIAMS, C. 1965. Programmed cell death. II. Endocrine potentiation of the breakdown of the intersegmental muscles of silkworms. *J. Insect Physiol.*, 11:803-809
- LUE, N.F.; KORNBERG, R.D. 1987. Accurate initiation at RNA polymerase II promoters in extracts from *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 84:8839-8843
- LUNDBLAD, V.; SZOSTAK, J.W. 1989. A mutant with a defect in telomere elongation leads to senescence in yeast. *Cell*, 57:633-643
- LURIA, S.E., DELBRÜCK, M. 1943. Mutations of bacteria from virus sensitivity to virus resistance. *Genetics*, 28:491-511
- LWOFF, A. 1953. Lysogeny. *Bacteriol. Rev.*, 17:269-337
- LWOFF, A.; GUTMANN, A. 1950. Recherches sur un *Bacillus megatherium* lisogène. *Ann. Inst. Pasteur*, 78:711
- LWOFF, A.; SIMINOVITCH, L.; KJELGAARD, N. 1950. Induction de la production de bactériophages chez une bactérie lysogène. *Ann. Inst. Pasteur*, 79:815
- MADDOX, B. 2003. The double helix and the “wronged heroine”. *Nature*, 421:407-408
- MAEKAWA, M.; YAMAGUCHI, K.; NAKAMURA, T.; SHIBUKAWA, R.; KODANAK, I.; ICHISAKA, T.; KAWAMURA, I.; MOCHIZUKI, H.; GOSHIMA, N.; YAMANAKA, S. 2011. Direct reprogramming of somatic cells is promoted by maternal transcription factor Glis1. *Nature*, 474:225-229
- MAHERALI, N.; SRIDHARAN, R.; XIE, W.; UTIKAL, J.; EMINLI, S.; ARNOLD, K.; STADTFELD, M.; YACHENKO, R.; HIEU, J. TC.; JAENISCH, R.; PLATH, K.; HOCHEDLINGER, K. 2007. Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodelling and widespread tissue contribution. *Cell Stem Cell*, 1:55-70
- MANSOUR, S.L.; THOMAS, K.R.; CAPECCHI, M.R. 1988. Disruption of the proto-oncogene int-2 in mouse-embryo-derived stem cells: a general strategy for targeting mutations to non-selectable genes. *Nature*, 336:348-352
- MANSY, S.S.; SCHRUM, J.P.; KRISHNAMURTHY, M.; TOBÉ, S.; TRECO, D.; SZOSTAK, J.W. 2008. Template-directed synthesis of a genetic polymer in a model protocell. *Nature*, 454:122-125
- MARCHETTO, M.C.N.; CARROMEU, C.; ACAB, A.; YU, D.; YEO, G.W. ; MU, Y.L. et al. 2010. A model for neural development and treatment of Rett syndrome using human induced pluripotent stem cells. *Cell*, 143:527-539
- MARINUS, M.G. 1976. Adenine methylation of Okazaki fragments in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 128:853-854
- MARINUS, M.G.; MORRIS, N.R. 1975. Pleiotropic effects of a DNA adenine methylation on mutation (*dam-3*) in *Escherichia coli* K12. *Mutation Res.*, 28:15-26

- MARION, R.M.; STRATI, K.; LI, H.; TEJERA, A.; SCHOEFTNER, S.; ORTEGA, S.; SERRANO, M.; BLASCO, M.A. 2009. Telomeres acquire embryonic stem cells characteristics in induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*, 4:141-154
- MARSDEN, V.S.; O'CONNOR, L.; O'REILLY, L.A.; SILKE, J.; METCALF, D.; EKERT, P.G.; HUANG, D.C.S.; CECCONI, F.; KUIDA, K.; TOMASELLI, K.J.; ROY, S.; NICHOLSON, D.W.; VAUX, D.L.; BOUILLET, P.; ADAMS, J.M.; STRASSER, A. 2002. Apoptosis initiated by Bcl-2-regulated caspase activation independently of the cytochrome c/Apaf-1/caspase-9-apoptosome. *Nature*, 419:634-637
- MARTIN, G.S. 1970. Rous sarcoma virus: A function required for the maintenance of the transformed state. *Nature*, 227:1021-1023
- MASUI, Y.; MARKERT, C. 1971. *J.Exp.Zool.*, 177:129-146
- MATTHAEI, J.H.; NIRENBERG, M.W. 1961. Characteristics and stabilization of DNase-sensitive protein synthesis in *E. coli* extracts. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 47:1580-1588
- MAXAM, A.M.; GILBERT, W. 1977. A new method for sequencing DNA. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 74:560-564
- McCLINTOCK, B. 1948. Mutable loci in maize. *Carnegie Inst. Wash. Year Book*, 47:155-169
- McCLINTOCK, B. 1949. Mutable loci in maize. *Carnegie Inst. Wash. Year Book*, 48:142-154
- McCLINTOCK, B. 1950. The origin and behavior of mutable loci in maize. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 36: 344-355
- McCLINTOCK, B. 1951. Chromosome organization and genic expression. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 16:13-47
- McCLINTOCK, B. 1957. Controlling elements and the gene. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 21:197-216
- McDEVITT, H.O.; BENACERRAF, B. 1969. Genetic control of specific immune responses. *Adv. Immunol.*, 11:31
- McGRATH, J.; SOLTER, D. 1984. Inability of mouse blastomere nuclei transferred to enucleated zygotes to support development *in vitro*. *Science*, 1317-1318
- MEISTER, G.; TUSCHI, T. 2004. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature*, 431:343-349
- MELLO, C.C.; CONTE, Jr. D. 2004. Revealing the world of RNA interference. *Nature*, 431:338-342
- MENDEL, G. 1886. Versuche über Pflanzenhybriden. *Verh. des Naturf. Vereines in Brünn (Abhandlungen)*, 4:3-47
- MESELSON, M., STAHL, F.W. 1958. The replication of DNA in *Escherichia coli*. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 44:671-682
- MIESCHER, F. 1871. Über die chemische Zusammensetzung der Eiterzellen. *Hoppe-Seylers's-Chemischen Untersuchungen*, 4:441-460
- MILSTEIN, C. 1980. Monoclonal antibodies. *Scient. Amer.*, 243(4):56-64
- MILSTEIN, C.; CUELLO, A.C. 1983. Hybrid hybridomas and their use in immunohistochemistry. *Nature*, 305:537-540

- MITSUI, K.; TOKUZAWA, Y.; ITOH, H.; SEGAWA, K.; MURAKAMI, M.; TAKAHASHI, K. *et al.* 2003. The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell*, 113:631-642
- MONOD, J.L. 1970. Le hasard et la nécessité. *Editions du Seuil*. (traducido al castellano con el título “El azar y la necesidad. Ensayo sobre la filosofía natural de la Biología moderna”, *Barral Editores*, 1970)
- MONTGOMERY, M.K.; XU, S.Q.; FIRE, A. 1998. RNA as target of double-stranded RNA-mediated genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 95:15502-15507
- MORENO, S.; NURSE, P. 1994. Regulation of progression through the G₁ phase of the cell cycle by the *rum¹⁺* gene. *Nature*, 367:219-220
- MORGAN, T.H. 1910. Sex limited inheritance in *Drosophila*. *Science*, 32:120-122
- MORGAN, T.H.; CATTELL, E. 1912. Data for the study of sexlinked inheritance in *Drosophila*. *Exp. Zool.*, 13:79
- MORGAN, T.H., STURTEVANT, A.H.; MULLER, H.J.; BRIDGES, C.B. 1915. The mechanism of mendelian inheritance. *Holt, New York*, 262 pp.
- MORIN, G.B. 1989. The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAAGGG repeats. *Cell*, 59:521-529
- MOYZIS, R.K. *et al.* 1988. A highly conserved repetitive DNA sequence (TTAGGG)_n, present at the telomeres of human chromosomes. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 85: 6622-6626
- MÜLLER, F.; WICKY, C.; SPICHER, A.; TOBLER, H. 1991. New telomere formation after developmentally regulated chromosomal breakage during the process of chromatin diminution in *Ascaris lubricoides*. *Cell*, 67:815-822
- MULLER, H.J. 1927. Artificial transmutation of the gene. *Science*, 66:84-87
- MULLER, H.J. 1928. The measurement of gene mutation rate in *Drosophila*, its high variability and its dependence upon temperature. *Genetics*, 13:279-357
- MULLER, H.J. 1938. The remaking chromosomes. *Collet. Net.* 13:181-195
- MULLIS, K.B. 1990. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scient. Amer.*, 262(4):36-43
- MULLIS, K.B.; FALOONA, F.A. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology*, 155:335-350
- MULLIS, K.B.; FALOONA, F.A.; SCHARF, S.; SAIKI, R.; HORN, G.; ERLICH, H. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 51:263-273
- NATHANS, D. 1979. Restriction endonucleases, simian virus 40, and the new genetics. *Science*, 206:903-909.(Conferencia Nobel 1978)

- NATHANS, D.; SMITH, H.O. 1975. Restriction endonucleases in the analysis and restructuring of DNA molecules. *Ann. Rev. Biochem.*, 44:273-293
- NEVERS, P.; SAEDLER, H. 1977. Transposable genetic elements as agents of gene instability and chromosomal rearrangements. *Nature*, 268:109-114
- NIH <http://www.ClinicalTrials.gov> (6 noviembre 2012)
- NIRENBERG, M.W.; MATTHAEI, J.H. 1961. The dependence of cell-free protein synthesis in *E. coli* upon naturally occurring or synthetic polyribonucleotides. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 47:1588-1602
- NISHIMURA, S.; JONES, D.S.; KHORANA, H.G. 1965a. Studies on polynucleotides. XLVIII. The *in vitro* synthesis of a co-polypeptide containing two amino acids in alternating sequence dependent upon a DNA-like polymer containing two nucleotides in alternating sequence. *J. Mol. Biol.*, 13:302-324
- NISHIMURA, S.; JONES, D.S.; OHTSUKA, E.; HAYATSU, H.; JACOB, T.M.; KHORANA, H.G. 1965b. Studies on polynucleotides. XLVII. The *in vitro* synthesis of homopeptides as directed by a ribopolynucleotide containing a repeating trinucleotide sequence. New codon sequences for lysine, glutamic acid and arginine. *J. Mol. Biol.*, 13:283-301
- NISSEN, P.; HANSEN, J.; BAN, N.; MOORE, P.B.; STEITZ, T.A. 2000. The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis. *Science*, 256:920-930
- NOVICK, P.; FIELD, C.; SCHECKMAN, R.W. 1980. Identification of 23 complementation groups required for post-translational events in the yeast secretory pathway. *Cell*, 21:205-215
- NOVICK, P.; FERRO, S.; SCHECKMAN, R.W. 1981. Order of events in the yeast secretory pathways. *Cell*, 25:461-469
- NOVICK, P.; SCHECKMAN, R.W. 1979. Secretion and cell-surface growth are blocked in a temperature-sensitive mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 76:1858-1862.
- NURSE, P. 1990. Universal control mechanisms regulating onset of M-phase. *Nature*, 344:503-508
- NURSE, P. 1994. Ordering S phase and M phase in the cell cycle. *Cell*, 79:547-550
- NURSE, P.; BISSETT, Y. 1981. Gene required in G₁ for commitment to cell cycle and in G₂ for control of mitosis in fission yeast. *Nature*, 292:558-560
- NÜSSLEIN-VOLHARD, C.; WIESCHAUS, E. 1980. Mutation affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature*, 287:795-801
- OGLE, J.M.; BRODERSEN, D.E.; CLEMONS, W.M.Jr.; TARRY, M.J.; CARTER, A.P.; RAMAKRISHNAN, V. 2001. Recognition of cognate transfer RNA by the 30S ribosomal subunit. *Science*, 292:897-902
- OGLE, J.M.; MURPHY, F.V.; TARRY, M.J.; RAMAKRISHNAN, V. 2002. Selection of tRNA by the ribosome requires a transition from an open to a closed form. *Cell*, 111:721-732
- OGLE, J.M.; RAMAKRISHNAN, V. 2005. Structural insights into translational fidelity. *Annu. Rev. Biochem.*, 74:129-177

- OKITA, K.; ICHISAKA, T.; YAMANAKA, S. 2007. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature*, 448:313-317
- OKITA, K.; NAKAWAGA, M.; HYENJONG, H.; ICHISAKA, T.; YAMANAKA, S. 2008. Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science*, 322:949-953
- OLBY, R. 1974a. The path to the double helix. *Macmillan*, XXIII+510 pp.
- OLBY, R. 1974b. DNA before Watson-Crick. *Nature*, 248:782-785
- OLBY, R.C. 1985. Origins of Mendelism (2nd edition). *University of Chicago Press, Chicago*, 310 pp.
- ORGEL, L.E. 1987. Evolution of the genetics apparatus: A review. En *Evolution of catalytic function, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 52:9-16
- ORGEL, L.E. 1994. The origin of life on the earth. *Scient. Amer.*, 271(4):53-61
- ORGEL, L.E.; CRICK, F.H.C. 1980. Selfish DNA: the ultimate parasite. *Nature*, 284:604-607
- ORKIN, S.H. 1986. Reverse Genetics and human disease. *Cell*, 47:845-850
- PACE, N.R.; OLSEN, G.J.; WOESE, C.R. 1986. Ribosomal RNA phylogeny and the primary lines of evolutionary descent. *Cell*, 45:325-326
- PANG, Z.P.; YANG, N.; VIERBUCHEN, T.; OSTERMEIER, A. ; FUENTES, D.R.; YANG, T.Q. *et al.* 2011. Induction of human neuronal cells by defined transcription factors. *Nature*, 476:220-223
- PARK, I.H. *et al.* 2008. Disease-specific induced pluripotent stem cells. *Cell*, 134:877-886
- PARRISH, S.; FLEENOR, J.; XU, S.Q.; MELLO, C.C.; FIRE, A. 2000. Functional anatomy of a dsRNA trigger: Differential requirements for the two trigger strands in RNA interference. *Mol. Cell*, 6:1077-1087
- PASSARGE, E. 2007. Color atlas of Genetics (3rd Edition, revised and updated), *Thieme, Stuttgart, Nueva York*
- PAULING, L. 1974. Molecular basis of biological specificity. *Nature*, 248:769-771
- PAULING, L.; ITANO, H.; SINGER, S.J.; WELLS, I.C. 1949. Sickle cell anaemia, a molecular disease. *Science*, 110:543-548
- PINCUS, G.; ENZMANN, E.V. 1935. The comparative behaviour of mammalian eggs in vivo and in vitro: I. The activation of ovarian eggs. *J. Exp. Med.*, 62:665-675
- PINILLOS, J.L. 1969. La mente humana. *Biblioteca Básica Salvat de Libros RTV*
- PÉREZ DE LA VEGA, M.; LACADENA, J.R. 1979. Cyto-histological studies on anther and pollen development in alloplasmic rye. *Cytologia*, 44:295-304.
- POLTORAK, A.; HE, X.; SMIRNOVA, I.; LIU, M.Y.; VAN HUFFEL, C.; DU, X.; BIRDWELL, D.; ALEJOS, E.; SILVA, M.; GALANOS, C.; FREUDENBERG, M.; RICCIARDI-CASTAGNOLI, P.; LAYTON, B.; BEUTLER, B. 1998. Defective LPS signalling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: Mutations in *Tlr4* gene. *Science*, 282:2085-2088.

- POPOVIC, M.; SARNGADHARAN, M.G.; READ, E.; GALLO, R.C. 1984. detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. *Science*, 224:497-500.
- PORTER, R.R. 1959. The hydrolysis of rabbit γ -globulin and antibodies with crystalline papain. *Biochem. J.*, 73:119-126
- PORTUGAL, F.H.; COHEN, J.S. 1977. A century of DNA. A history of the discovery of the structure and function of the genetic substance. *The MIT Press, Cambridge, Massachusetts*, XIII+384 pp.
- PRASHER, D.; ECKENRODE, V.K.; WARD, W.W.; PENDERGAST, F.G.; CORMIER, M.J. 1992 Primary structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Gene*, 111:229-233
- RAMÓN Y CAJAL, S. 1897. Reglas y consejos sobre investigación científica (los tónicos de la voluntad). *Discurso leído en la Sesión del 5 de Diciembre de 1897 al ingresar en la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales* (Recogido en sus *Obras literarias completas*, M. Aguilar, Editor, Madrid, 1947)
- RASHID, S.T.; CORBINEAU, S.; HANNAN, N. ; MARCINIAK, S.J. ; MIRANDA, E. ; ALEXANDER, G. *et al.* 2010. Modeling inherited metabolic disorders of the liver using human induced pluripotent stem cells. *J. Clin. Invest.*, 120:3127-3136
- RATNER, L.; GALLO, R.C.; WONG-STAAAL, F. 1985. HTKV-III, LAV, ARV are variants of same AIDS virus. *Nature*, 313:636-637
- RHO, H.M.; POIESZ, B.; RUSCETTI, F.W.; GALLO, R.C. (1981): Characterization of the reverse transcriptase from a new retrovirus (HTLV) produced by a human cutaneous T-cell lymphoma cell line. *Virology*, 112:355-360
- RICH, A. 1993. Robert W. Holley (1922-1993). *Nature*, 362:16
- RICHMOND, T.J.; FINCH, J.T.; RUSHTON, B.; RHODES, D.; KLUG, A. 1984. Structure of the nucleosome core particle at 7A resolution. *Nature*, 311:532-537
- RIEGER, R.; MICHAELIS, A.; GREEN, M.M. 1976. Glossary of Genetics. Classical and Molecular (Fourth completely revised edition). *Springer-Verlag, Berlin*, 647 pp.
- RIEGER, R.; MICHAELIS, A.; GREEN, M.M. 1976. Glossary of Genetics and Cytogenetics. (4th edition), *Springer Verlag, Berlin-Heidelber-Nueva York* (existe una traducción en español por M.J. Puertas , *Editorial Alhambra*, 1982)
- RIEGER, R.; MICHAELIS, A.; GREEN, M.M. 1991. Glossary of Genetics. Classical and Molecular (Fifth edition). *Springer-Verlag, Berlin*, 553 pp.
- ROBERTSON, E.; BRADLEY, A.; KUEHN, M.; EVANS, M.J. 1986. Germ-line transmission of genes introduced into cultured pluripotential cells by retroviral vector. *Nature*, 323:445-448
- ROCHELAU, C.E.; DOWNS, W.D.; LIN, R.; WITTMAN, C.; BEI, Y.; CHA, Y.H.; ALI, M.; PRIESS, J.R.; MELLO, C.C. 1997. Wnt signalling and an APC-related gene specify endoderm in early *C.elegans* embryos. *Cell*, 90:707-716

- ROMERO, D.P.; BLACKBURN, E.H. 1991. A conserved secondary structure for telomerase RNA. *Cell*, 67:343-353
- RUBIO, J. 1973. Genética. Su posición entre las ciencias biológicas. *Boletín Est. Exp. Aula Dei*, nº 12, 80 pp.
- RUPERT, C.S. 1960. Photoreactivation of transforming DNA by an enzyme from bakers` yeast. *J. Gen. Physiol.*, 43:573-595
- SAIKI, R.K.; SCHARF, S.; FALOONA, F.; MULLIS, K.B.; HORN, G.T., ERLICH, H.A.; ARNHEIM, N. 1985. Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230:1350-1354
- SANCAR, A.; HACKL, A.M.; RUPP, W.D. 1979. Simple method for identification of plasmid-coded proteins. *J. Bacteriol.*, 137:692-693
- SANCAR, A.; RUPERT, C.S. 1978. Cloning of the phr gene and amplification of photolyase in Escherichia coli. *Gene* 1978; 4:295-308
- SANCAR, A.; RUPP, W.D. 1983. A novel repair enzyme: UVRABC excision nuclease of Escherichia coli cuts a DNA strand on both side of the damaged región. *Cell*, 33:249-260
- SANGER, F. 1955. The chemistry of simple proteins. *Symp. Soc. Exp. Biol.*, 9:10-31
- SANGER, F.; COULSON, A.R. 1975. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J. Mol. Biol.*, 94:441-448
- SANGER, F.; AIR, G.M.; BARRELL, B.G.; BROWN, N.L.; COULSON, A.R.; FIDDES, J.C.; HUTCHISON, C.V. III; SLOCOMBE, P.M.; SMITH, M. 1977a. Nucleotide sequence of bacteriophage ϕ 174 DNA. *Nature*, 265:687-695
- SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.R. 1977b. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 74:5463-5467
- SARABHAI, A.S. ; STRETTON, A.O.W. ; BRENNER, S. ; BOLLE, A. 1964. Co-linearity of the gene with the polypeptide chain. *Nature*, 201:13-17
- SARNGADHARAN, M.G.; POPOVIC, M.; BRUCH, L.; SCHÜPBACH, J.; GALLO, R.C. 1984. Antibodies reactive with human T-lymphotropic retroviruses (HTLV-III) in the serum of patients with AIDS. *Science*, 224:506-508
- SAYRE, M.H.; TESCHNOCHNER, H.; KORNBERG, R.D. 1992. Reconstitution of transcription with five purified protein factors and RNA polymerase II from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, 267:23376-23382
- SCHLUENZEN, F.; TOCILJ, A.; ZARIVACH, R.; HARMS, J.; GLUEHMANN, M.; JANELL, D.; BASHAN, A.; BARTELS, H.; AGMON, I.; FRANCESCHI, F. and YONATH, A. 2000. Structure of functionally activated small ribosomal subunit at 3.3 Ångstroms resolution. *Cell*. 102:615-623

- SCHMEING, T.M.; HUANG, K.S.; KITCHEN, D.E.; STROBEL, S.A.; STEITZ, T.A. 2005. Structural insights into the roles of water and the 2' hydroxyl of the P site tRNA in the peptidyl transferase reaction. *Mol. Cell*, 20:437-448
- SCHULER, G.; STEINMAN, R.M. 1985. Murine epidermal Langerhans cells mature into potent immunostimulatory dendritic cells in vitro. *J. Exp. Med.*, 161:526-546.
- SCHÜPBACH, J.; POPOVIC, M.; GILDEN, R.V.; GONDA, M.A.; SARNGADHARAN, M.G.; GALLO, R.C. 1984. Serological analysis of a subgroup of human T-lymphotropic retroviruses (HTLV-III) associated with AIDS. *Science*, 224:503-505
- SELMER, M.; DUNHAM, C.M.; MURPHY, F.V.; WEIXLBAUMER, A.; PETRY, S.; KELLEY, A.C.; WEIR, J.R. and RAMAKRISHNAN, V. 2006. Structure of the 70S ribosome complexed with mRNA and tRNA. *Science*. 313: 1935-1942
- SETLOW, R.B'; CARRIER, W.L. 1964. The Disappearance of Thymine Dimers from DNA: An Error-Correcting Mechanism. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 51:226-231
- SETLOW, R.B.; SETLOW, J.K. 1962. Evidence that ultraviolet-induced thymine dimers in DNA cause biological damage. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 48:1250-1257
- SEXTON, C. 1992. The seeds of time: The life of Sir Macfarlane Burnet. *Oxford University Press, Oxford*, 300 pp.
- SHANER, N.C.; CAMPBELL, R.E.; STEINBACH, P.A.; GIEPMANS, B.N.G. ; PALMER, A.E.; TSIEN, R.Y. 2004. Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent propeins derived from *Discosoma* sp red fluorescent protein. *Nature Biotechnology*, 22:1562-1572
- SHANER, N.C.; LIN, M.Z.; McKEOWN, M.R.; STEINBACH, P.A.; HAZELWOOD, K.L.; DAVIDSON, M.W.; TSIEN, R.Y. 2008. Improving the photostability of bright monomeric orange and red fluorescent proteins. *Nature Methods*, 5:545-551
- SHANER, N.C.; PATTERSON, G.H.; DAVIDSON, M.W. 2007. Advances in fluorescent protein technology. *J.Cell Sci.*, 120:4247-4260
- SHAPIRO, J.A.(ed.). 1983. Mobile genetic elements. *Academic Press, New York*, XVI+688 pp.
- SHARP, P.A. 1981. Speculations on RNA splicing. *Cell*, 23:643-646
- SHARP, P.A. 1985. On the origin of RNA splicing and introns. *Cell*, 42:397-400
- SHARP, P.A. 1987. Splicing of messenger RNA precursors. *Science*, 235:766-771
- SHARP, P.A. 1994. Split genes and RNA splicing. *Cell*, 77:805-815
- SHIMOMURA, O. 1979. Structure of the chromophore of *Aequorea* green fluorescent protein. *FEBS Letter*, 104:220-222
- SHIMOMURA, O.; JOHNSON, F.H.; SAIGA, Y. 1962. Extraction, puriofication and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *J.Cell.Comp.Physiol.*, 59:223-229

- SIEVERS, A.; BERINGER, M.; RODNINA, M.V.; WOLFENDEN, R. 2004. The ribosome as an entropy trap. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 101:7897-7901
- SLIGHTORN, J.L.; BLECHL, A.E.; SMITHIES, O. 1980. Human fetal Gg y Ag globin genes: Complete nucleotide sequences suggest that DNA can be exchanged between these duplicated genes. *Cell*, 21:627-638
- SMITH, M. 1985. In vitro mutagenesis. *Ann. Rev. Genet.*, 19:423-462
- SMITHIES, O.; CONNELL, G.E.; DIXON, G.H. 1962. Chromosomal rearrangements and the evolution of haptoglobin genes. *Nature*, 196:232-236
- SMITHIES, O.; GREGG, R.G.; BOGGS, S.S.; DORALEWSKI, M.A.; KUCHERLAPATI, R.S. 1985. Insertion of DNA sequences into the human beta-globin locus by homologous recombination. *Nature*, 317:230-234
- SMITHIES, O.; MAEDA, N. 1995. Gene targeting approaches to complex genetic diseases: Atherosclerosis and essential hypertension. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 92:5266-5272
- SNELL, G.D. 1948. Methods for the study of histocompatibility genes. *J. Genetics*, 49:87-108
- SNELL, G.D. 1953. The genetics of transplantation. *J. Nat. Cancer Inst.*, 14:691-700
- SNELL, G.D.; RUSSELL, E.; FEKETE, E.; SMITH, P. 1953. Resistance of various inbred strains of mice to tumor homoiotransplants, and its relation to the *H-2* allele which each carries. *J. Natl. Cancer Inst.*, 14:485-491
- SNOUWAERT, J.N.; BRIGMAN, K.K.; LATOUR, A.M.; MALOUF, N.N.; BOUCHER, R.C.; SMITHIES, O. et al. 1992. An animal model for cystic fibrosis made by gene-targeting. *Science*, 257:1083-1088
- SOLLNER, T.; WHITEHEART, W.; BRUNNER, M.; ERDJUMENT-BROMAGE, H.; GEROMANOS, S.; TEMPST, P.; ROTHMAN, J.E. 1993. SNAP receptor implicated in vesicle targeting and fusión. *Nature*, 362:318-324
- SONG, K.H.; NAM, Y.J.; LUO, X.; QI, X.X.; TAN, W.; HUANG, G.N. et al. 2012. Heart repair by reprogramming non-myocytes with cardiac transcription factors. *Nature*, 485:599-604
- SPEYBROEK, I. van. 2002. From epigenesis to epigenetics. The case of C.H. Waddington. *Ann. NY Acad. Sci.*, 981:61-81
- STADLER, L.J. 1928a. Genetic effects of X-rays in maize. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 14:69-75
- STADLER, L.J. 1928b. Mutations in barley induced by X-rays and radium. *Science*, 68:186-187
- STEHELIN, D.; VARMUS, H.E.; BISHOP, J.M.; VOGT, P.K. 1976. DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA. *Nature*, 260:170-173
- STEINMAN, R.M.; COHN, Z.A. 1973. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. *J. Exp. Med.*, 137:1142-1162.
- STEINMAN, R.M.; WITMER, M.D. 1978. Lymphoid dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 75:5132-5136.
- STENT, G.S. 1971. Molecular Genetics. An introductory narrative. *W.H. Freeman and Co., San Francisco*

- STENT, G.S.; CALENDAR, R. 1978. *Molecular Genetics. An introductory narrative (Second edition).* W.H.Freeman and Co., San Francisco
- STEPTOE, P.C.; EDWARDS, R.G. 1970. Laparoscopic recovery of preovulatory human oocytes after priming of ovaries with gonadotrophins. *Lancet*, 1:683-689
- STEPTOE, P.C.; EDWARDS, R.G.; PURDY, J.M. 1971. Human blastocysts grown in culture. *Nature*, 229:132-133
- STEPTOE, P.C.; EDWARDS, R.G. 1976. Reimplantation of a human embryo with subsequent tubal pregnancy. *Lancet*, 1:880-882
- STEPTOE, P.C.; EDWARDS, R.G. 1978. Birth after the reimplantation of a human embryo. *Lancet*, 2:366
- STERN, C. 1931. Zytologisch-genetische Untersuchungen als Beweise für die Morgansche Theorie des Faktorensaustausch. *Biol. Zentralbl.*, 51:547-587
- STERNBERG, P.W.; HORVITZ, H.R. 1984. Genetic control of cell lineage during nematode development. *Ann. Rev. Genet.*, 18:489-524
- STUDIER, F.W. 1972. Bacteriophage T7. *Science*, 176:367-376
- STURTEVANT, A.H. 1913. The linear arrangement of six sex-linked factors in *Drosophila*, as shown by their mode of association. *J. Exp. Zool.*, 14:43-59
- SULSTON, J.E. ; BRENNER, S. 1974. The DNA of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 77 :95-104
- SULSTON, J.E. ; HORVITZ, H.R. 1977. Post-embryonic cell lineages of the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.*, 56:110-156
- SULSTON, J.E. ; SCHIERENBERG, E. ; WHITE, J.G. ; THOMSON, J.N. 1983. The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.*, 100:64-119
- SUTTON, W.S. 1902. On the morphology of the chromosome group in *Brachystola magna*. *Biol. Bull.*, 4:24-39
- SUTTON, W.S. 1903. The chromosomes in heredity. *Biol. Bull.*, 4:231-251
- SÜSKIND, P. 1985. El perfume. *Seix Barral, S.A., Barcelona*
- SZABO, E.; RAMPALLI, S.; RISUEÑO, R.M.; SCHNERCH, A.; MITCHELL, R.; FIEBIG-COMYN, A.; LEVADOUX-MARTIN, M.; BHATIA, M. 2010. Direct conversion of human fibroblasts to multilineage blood progenitors. *Nature on line* (7 November 2010) doi:10.1038/nature 09591
- SZOSTAK, J.W. 1982. Replication and resolution of telomeres in yeast. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 47:1187-1194
- SZOSTAK, J.W. 1989. The beginning of the ends. *Nature*, 337:303-304
- SZOSTAK, J.W.; BLACKBURN, E.H. 1982. Cloning yeast telomeres on linear plasmid vectors. *Cell*, 29:245-255
- SZOSTAK, J.W.; MURRAY, A.W.; CLAUS, T.; DUNN, B. 1984. Telomeres and artificial chromosomes in yeast. *Chromosomes Today*, 8:59-68

- TADA, M.; TAKAHAMA, Y.; ABE, K.; NAKATSUJI, N.; TADA, T. 2001. Nuclear reprogramming of somatic cells by in vitro hybridization with ES cells. *Curr. Biol.*, 11:1553-1558
- TAKAHASHI, K.; MITSUI, K.; YAMANAKA, S. 2003. Role of Eras in promoting tumour-like properties in mouse embryonic stem cells. *Nature*, 423:541-545
- TAKAHASHI, K.; TANABE, K.; OHNUKI, M.; NARITA, M.; ICHISAKA, T.; TOMODA, K.; YAMANAKA, S. 2007. Induction of pluripotent cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, 131:1-12
- TAKAHASHI, K.; YAMANAKA, S. 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126:663-676
- TAKESHIGE, K.; BABA, M.; TSUBOI, S.; NODA, T.; OHSUMI, Y. 1992. Autophagy in yeast demonstrated with proteinase-deficient mutants and conditions for its induction. *J Cell Biol.*, 119:301-11
- TATUM, E.L.; LEDERBERG, J. 1947. Gene recombination in the bacterium *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 53:673
- TAYLOR, J.H.; WOODS, P.S.; HUGHES, W.L. 1957. The organization and duplication of chromosomes as revealed by autoradiographic studies using tritium-labeled thymidine. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 43:122-128
- TEMIN, H.M. 1964. Homology between RNA from Rous sarcoma virus and DNA from Rous sarcoma virus-infected cells. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 52:323-329
- TEMIN, H.M. 1972. RNA-directed DNA synthesis. *Scient. Amer.*, 226:24-33
- TEMIN, H.M. 1974. On the origin of RNA tumor viruses. *Ann. Rev. Genet.*, 8:155-177
- TEMIN, H.M.; BALTIMORE, D. 1972. RNA-directed DNA synthesis and RNA tumor viruses. *Adv. Virus Res.*, 17:128-186
- TEMIN, H.M.; MIZUTANI, S. 1970. RNA-dependant DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature*, 226:1211
- THE *C. ELEGANS* SEQUENCING CONSORTIUM. 1998. Genome sequence of the nematode *C. elegans*: A platform for investigating biology. *Science*, 282:2012-2018
- THE HD iPSC CONSORTIUM. 2012. Induced pluripotent stem cells from patients with Huntington's disease show CAG-repeat-expansion-associated phenotypes. *Cell Stem Cell*, 11:264-278
- THOMAS, K.R.; CAPECCHI, M.R. 1987. Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell*, 51:503-512
- THOMAS, K.R.; FOLGER, K.R.; CAPECCHI, M.R. 1986. High frequency targeting of genes to specific sites in the mammalian genome. *Cell*, 44:419-428
- THOMSON, J.A.; ITSKOVITZ-ELDOR, J.; SHAPIRO, S.S.; WAKNITZ, M.A.; SWIERGIEL, J.J.; MARSHALL, V.S.; JONES, J.M. 1998. Embryonic stem cells derived from human blastocysts. *Science*, 282:1145-1147
- THORNBERRY, N.A.; LAZEBNIK, Y. 1998. Caspases: Enemies within. *Science*, 281:1312-1316
- TONEGAWA, S. 1983. Somatic generation of antibody diversity. *Nature*, 302:575-581

- TONEGAWA, S.; BRACH, C.; HOZUMI, N.; PIRROTTA, V. 1977. Organization of immunoglobulin genes. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 42:921-931
- TROBRO, S.; ÅQVIST, J. 2005. Mechanism of peptide bond synthesis on the ribosome. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 102: 12395-12400
- TROBRO, S.; ÅQVIST, J. 2006. Analysis of predictions for the catalytic mechanism of ribosomal peptidyl transfer. *Biochemistry*, 45:7049-7056
- TSCHERMAK, E. 1900. Über Künstliche Kreuzung bei *Pisum sativum*. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft*, 18:232-239
- TSIEN, R.Y. 1998. The green fluorescent protein. *Annu. Rev. Biochem.*, 67:509-544
- TSUJI, O.; MIURA, K.; OKADA, Y.; FUJIYOHJI, K.; MUKAINO, M.; NAGOSHI, N.; KITAMURA, K.; KUMAGAI, G.; NISHINO, M.; TOMISATO, S.; HIGASHI, H.; NAGAI, T.; KATOH, H.; KOHDA, K.; MATSUZAKI, Y.; YUZAKI, M.; IKEDA, E.; TOYAMA, Y.; NAKAMURA, M.; YAMANAKA, S.; OKANO, H. 2010. Therapeutic potential of appropriately evaluated safe-induced pluripotent stem cells for spinal cord injury. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, doi: 10-1073/pnas.0910106107 (6 julio 2010)
- TSUKADA, M.; OHSUMI, Y. 1993. Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.*, 25; 333:169-174
- TUSCHI, T.; ZAMORE, P.D.; LEHMAN, R.; BARTEL, D.P.; SHARP, P.A. 1999. Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA *in vitro*. *Genes Devel.*, 13:3191-3197
- VAUX, D.L.; KORSMEYER, S.J. 1999. Cell death in development. *Cell*, 96:245-254
- VAUX, D.L.; WEISSMAN, I.L.; KIM, S.K. 1992. Prevention of programmed cell death in *Caenorhabditis elegans* by human bcl-2. *Science*, 258:1955-1957
- VIERBUCHEN, T.; OSTERMEIER, A.; PANG, Z.P.; KOKUBU, Y.; SUDOHF, T.C.; WERNIG, M. 2010. Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature online* (27 January 2010) doi: 10.1038/nature 08797.
- VILMER, E.; BARRÉ-SINOUSI, F.; ROUZIOUX, C. ; GAZENGEL, C. ; BRUN, F.V. ; DAUGUET, C. ; FISCHER, A. ; MANIGNE, P. ; CHERMAN, J.C. ; GRISCELLI, C. ; MONTAGNIER, L. 1984. Isolation of new lymphotropic retrovirus from two siblings with haemophilia B, one with AIDS. *Lancet*, 1:753-757
- VOORHEES, R.M.; WEIXLBAUMER, A.; LOAKES, D.; KELLEY, A.C.; RAMAKRISHNAN, V. 2009. Insights into substrate stabilization from snapshots of the peptidyl transferase center of the intact 70S ribosome. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 16:528-533
- DE VRIES, H. 1900. Sur la loi de disjonction des hybrides. *Compt. Rend. Acad. Sci.*, (Paris), 130:845-847
- WADDINGTON, C.H. 1939. An introduction to modern Genetics. *Allen & Unwin, Londres.*
- WADDINGTON, C.H. 1940. The genetic control of wing development in *Drosophila*. *J. Genet.*, 41:75

- WADDINGTON, C.H. 1957. The strategy of the genes; a discusión of some aspects of theoretical biology. *Allen & Unwin*
- WAGNER, R. Jr, MESELSON, M. 1976. Repair tracts in mismatched DNA heteroduplexes. *Proc Nat Acad Sci*, 73:4135-4139
- WAIN-HOBSON, S.; ALIZON, M.; MONTAGNIER, L. 1985 Relationship of AIDS to other retroviruses. *Nature*, 313:743
- WANG, F.; NEMES, A.; MENDELSON, M.; AXEL, R. 1998. Odorant receptors govern the formation o a precise topographic map. *Cell*, 93:47-60
- WARREN, L.; MANOS, P.D.; AHFELDT, T.; LOH, Y-H.; LI, H.; LAU, F.; EBINA, W.; MANDAL, P.K.; SMITH, Z.D.; MEISSNER, A.; DALEY, G.Q.; BRACK, A.S.; COLLINS, J.J.; COWAN, C.; SCHLAEGER, T.M.; ROSSI, D.J. 2010. Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. *Cell Stem Cell*, 7:1-13
- WATSON, J.D. 1968. The double helix. *Weidenfeld and Nicolson, London*, XVI+226 pp. (traducida al castellano con el título "La doble hélice")
- WATSON, J.D. 1990. The Human Genome Project: Past, present and future. *Science*, 248:44-49
- WATSON, J.D.; CRICK, F.H.C. 1953a. The molecular structure of nucleic acids. A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*, 171:737-738
- WATSON, J.D.; CRICK, F.H.C. 1953b. Genetical implications of the structure of deoxyribonucleic acid. *Nature*, 171:964-967
- WATSON, J.D.; HOPKINS, N.H.; ROBERTS, J.W.; STEITZ, J.A.; WEINER, A.M. 1987. Molecular Biology of the Gene (Fourth edition). *The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., Menlo Park, California*, XXX+1163 pp.+I-26 pp.
- WEINGER, J.S.; PARNELL, K.M.; DORNER, S.; GREEN, R.; STROBEL, S.A. 2004. Substrate-assisted catalysis of peptide bond formation by the ribosome. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 11:1101-1106
- WEIXLBAUMER, A.; HIN, H.; NEIBAUER, C.; VOORHEES, R.M.; PETRY, S.; KELLEY, A.C.; RAMAKRISHNAN, V. 2008. Insights into translational termination from the structure of RF2 bound to the ribosome. *Science*, 322:953-956
- WERNIG, M.; MEISSNER, A.; FOREMAN, R.; BRAMBRINK, T.; KU, M.; HOCHEDLINGER, K.; BERNSTEIN, B.E.; JAENISCH, R. 2007. In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature*, 448:318-324
- WILKINS, M.H.F.; STOKES, A.R.; WILSON, H.R. 1953. Molecular structure of deoxypentose nucleic acid. *Nature*, 171:738-740

- WIMBERLY, B.T.; BRODERSEN, C.E.; CLEMONS, W.M.; MORGAN-WARREN, R.J.; CARTER, A.P.; VONRHEIN, C.; HARTSCH, T. and RAMAKRISHNAN, V. 2000. Structure of the 30S ribosomal subunit. *Nature*, 407: 327-339
- WILMUT, I.; SCHNIEKE, A.E.; McWHIR, J.; KIND, A.J.; CAMPBELL, K.H.S. 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, 385:810-813
- WINKLER, H. 1930. Die Konversion der Gene. *Jena: Gustav Fischer*
- WOLPERT, L.; BEDDINGTON, R.; JESSELL, T.; LAWRENCE, P.; MEYEROWITZ, E.; SMITH, J. 2002. Principles of Development (Second edition), *Oxford University Press, Oxford*
- XU, D.; ALIPIO, Z.; FINK, L.M.; ADCOCK, D.M.; YANG, J.; WARD, D.C.; MA, Y. 2009. Phenotypic correction of murine hemophilia A using an iPS cell-based therapy. *Proc Nat Acad Sci*, 106:808-813
- YAMANAKA, S. 2007. Strategies and new developments in the generation of patient-specific pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*, 1:39-49
- YAMANAKA, S. 2012. Induced pluripotent stem cells: Past, present, and future. *Cell Stem Cell*, DOI 10.1016/j.stem.2012.05.005
- YANAGIMACHI, R.; CHANG, M.C. 1963. Fertilization of hamster eggs in vitro. *Nature*, 200:281-282
- YONATH, A.; BARTUNIK, H.D.; BARTELS, K.S.; WITTMANN, H.G. 1984. Some x-ray diffraction patterns from single crystals of the large ribosomal subunit from *Bacillus stearothermophilus*. *J. Mol. Biol.*, 177:201-206.
- YONATH, A.; MUSSIG, J.; TESCHE, B.; LORENZ, S.; ERDMANN, V.A.; WITTMANN, H.G. 1980. Crystallization of the large ribosomal subunits from *Bacillus steaorthemophilus*. *Biochem. Int.*, 1:428-435.
- YU, G-L. BLACKBURN, E.H. 1991. Developmental programmed healing of chromosome by telomerase in *Tetrahymena*. *Cell*, 67:823-832
- YU, J.; VODYANIK, M.A.; SMUGA-OTTO, K.; ANTOSIEWICZ-BOURGET, J.; FRANE, J.L.; TIAN, S.; NIE, J.; JONSDOTTIR, G.A.; RUOTTI, V.; STEWART, R.; SLUKVIN, I.I.; THOMSON, J.A. 2007. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*, 318:1917-1920
- ZAMORE, P.D.; TUSCHI, T.; SHARP, P.A.; BARTEL, D.P. 2000. RNAi: Double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell*, 101:25-33
- ZAUG, A.J., CECH, T.R. 1986. The intervening sequence RNA of *Tetrahymena* is an enzyme. *Science*, 231:470-475.
- ZHOU, H.; WU, S.; JOO, J.Y.; ZHU, S.; HAN, D.W.; LIN, T.; TRAUGER, S.; BIEN, G.; YAO, S.; ZHU, Y.; SIUZDAK, G.; SCHÖLER, H.R.; DUAN, L.; DING, S. 2009. Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. *Cell Stem Cell*, doi: 10.1016/j.stem.2009.04.005
- ZHOU, Q.; BROWN, J.; KANAREK, A.; RAJAGOPAL, J.; MELTON, D.A. 2008. In vivo reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to β -cells. *Nature*, 455:627-632

- ZHU, T.F.; SZOSTAK, J.W. 2009. A robust pathway for protocell growth and division under plausible prebiotic conditions. *J. Am. Chem. Soc.*, 131:5705-5713
- ZOU, Z.; HOROWITZ, L.S.; MONTMAYEUR, J-P.; SNAPPER, S.; BUCK, L.B. 2001. Genetic tracing reveals the stereotyped sensory map in the olfactory cortex. *Nature*, 414:173-179

CUADRO 1.1

CUADRO 1.1 (volver página anterior)

PREMIOS NOBEL RELACIONADOS CON LA GENÉTICA (Todos ellos de Fisiología o Medicina, salvo indicación expresa)	
1910	ALBRECHT KOSSEL : “por sus trabajos sobre las sustancias albuminoides, incluyendo las nucleínas, que han contribuido al conocimiento de la química de las células”
1930	KARL LANDSTEINER : “por sus descubrimientos de los grupos sanguíneos de la especie humana”
1933	THOMAS H. MORGAN : “por su descubrimiento sobre la función de los cromosomas como portadores de la herencia”
1946	HERMANN J. MULLER : “por su descubrimiento de la inducción de mutaciones mediante radiación con rayos X”
1957	Alexander R. TODD : “por su trabajo sobre nucleótidos y co-enzimas nucleotídicas” (Química)
1958	GEORGE W. BEADLE y EDWARD L. TATUM : “por su descubrimiento de que los genes actúan regulando sucesos químicos definidos” JOSHUA LEDERBERG : “por sus descubrimientos relacionados con la recombinación genética y la organización del material genético en las bacterias”
1959	SEVERO OCHOA y ARTHUR KORNBERG : “por su descubrimiento de los mecanismos en la síntesis biológica de los ácidos ribonucleico y desoxirribonucleico”
1960	PETER MEDAWAR y FRANK MACFARLANE BURNET : “por su descubrimiento de la tolerancia inmunológica adquirida”
1962	JAMES D. WATSON , FRANCIS H. C. CRICK y MAURICE H. F. WILKINS : “por sus descubrimientos en relación con la estructura molecular de los ácidos nucleicos y su significación para la transmisión de la información en la materia viva”
1965	FRANCOIS JACOB , JACQUES MONOD y ANDRE LWOFF : “por sus descubrimientos en relación con el control genético de la síntesis de enzimas y virus”
1968	ROBERT W. HOLLEY , HAR GOBIND KHORANA y MARSHALL W. NIRENBERG : “por su interpretación del código genético y su función en la síntesis de proteínas”
1969	MAX DELBRÜCK , SALVADOR E. LURIA y ALFRED D. HERSHEY : “por sus descubrimientos sobre el ciclo de reproducción de los virus y el papel del material genético en las bacterias y los virus”

1970	NORMAN E. BORLAUG : “por su contribución a la revolución verde”. (Paz)
1972	RODNEY R. PORTER y GERALD M. EDELMAN : “por sus descubrimientos sobre la estructura química de los anticuerpos”. (Química)
1973	KARL R. von FRISCH , Karl LORENZ y Nikolaas TINBERGEN “por sus descubrimientos en relación con la organización y elucidación de los patrones de comportamiento individual y social”
1975	RENATO DULBECCO , DAVID BALTIMORE y HOWARD M. TEMIN : “por sus descubrimientos en relación con la interacción entre los virus tumorales y el material genético en la célula”
1978	WERNER ARBER , HAMILTON O. SMITH y DANIEL NATHANS : “por su descubrimiento de las endonucleasas de restricción y su aplicación en genética molecular”
1980	GEORGE SNELL , BARUJ BENACERRAF y JEAN DAUSSET : “por sus descubrimientos sobre las estructuras de las superficies celulares genéticamente determinadas que rigen las reacciones inmunológicas”
1980	PAUL BERG : “por sus estudios fundamentales de bioquímica sobre ácidos nucleicos, en particular el ADN recombinante”. (Química) WALTER GILBERT y FREDERICK SANGER : “por sus contribuciones a la determinación de las secuencias de bases en los ácidos nucleicos”. (Química)
1982	AARON KLUG : “por su desarrollo de la microscopía electrónica cristalográfica y sus descubrimientos sobre la estructura de complejos de ácidos nucleicos-proteínas biológicamente importantes”. (Química)
1983	BARBARA McCLINTOCK : “por su descubrimiento de estructuras móviles en la masa genética”
1984	NIELS K. JERNE : “por sus teorías sobre la especificidad en el desarrollo y control de los sistemas de inmunidad” GEORGE J. F. KÖHLER y CESAR MILSTEIN : “por su descubrimiento del principio que rige la producción de anticuerpos monoclonales”
1987	SUSUMU TONEGAWA : “por su descubrimiento del fundamento genético de la formación de una rica variedad de anticuerpos”
1989	J. MICHAEL BISHOP y HAROLD E. VARMUS : “por sus descubrimientos sobre el origen celular de los oncogenes retrovirales”
1989	SIDNEY ALTMAN y THOMAS R. CECH : “por su descubrimiento de las propiedades catalíticas del ácido ribonucleico (ARN)”. (Química)
1993	RICHARD J. ROBERTS y PHILLIP A. SHARP : “por el descubrimiento de los genes discontinuos”

1993	KARY B. MULLIS : “por su invención del método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR)”. (Química) MICHAEL SMITH : “por su contribución fundamental al establecimiento de la mutagénesis dirigida mediante oligonucleótidos y su desarrollo para estudios de proteínas”. (Química)
1995	EDWARD B. LEWIS , CHRISTIANE NÜSSLEIN-VOLHARD y ERICK F. WIESCHAUS : “por sus descubrimientos sobre el control genético del desarrollo temprano del embrión”
1996	PETER C. DOHERTY y ROLF M. ZINKERNAGEL : “por sus descubrimientos en relación con la especificidad de la respuesta inmune mediatizada por células”
2001	LELAND H. HARTWELL , R. TIMOTHY HUNT y PAUL M. NURSE : “por sus descubrimientos de los reguladores clave del ciclo celular”
2002	SYDNEY BRENNER , H. ROBERT HORVITZ y JOHN E. SULSTON : “por sus descubrimientos sobre la regulación genética del desarrollo de los órganos y la muerte celular programada”
2004	RICHARD AXEL y LINDA B. BUCK : “por sus descubrimientos de receptores olorosos y la organización del sistema olfativo”
2006	ANDREW Z. FIRE y CRAIG C. MELLO : “por su descubrimiento de la interferencia por ARN: silenciamiento de genes por ARN de doble cadena”
2006	ROGER D. KORNBERG : “por sus estudios de la base molecular de la transcripción eucariótica” (Química)
2007	MARIO R. CAPECCHI , MARTIN J. EVANS y Oliver SMITHIES : “por sus descubrimientos de los principios para introducir modificaciones génicas específicas en ratones mediante el uso de células troncales embrionarias”
2008	HARALD zur HAUSEN : “por su descubrimiento de los virus del papiloma humano que causan el cáncer cervical” FRANÇOISE BARRÉ-SINOUSI y LUC MONTAGNIER : “por su descubrimiento del virus de la inmunodeficiencia humana”
2008	OSAMU SHIMOMURA , MARTIN CHALFIE y ROGER Y. TSIEN : “por el descubrimiento y desarrollo de la proteína fluorescente verde, GFP” (Química)
2009	ELIZABETH H. BLACKBURN , CAROL W. GREIDER y JACK W. SZOSTAK : “por el descubrimiento de cómo los cromosomas son protegidos por los telómeros y la enzima telomerasa”
2009	VENKATRAMAN RASMAKRISHNAN , THOMAS A. STEITZ y ADA E. YONATH : “por los estudios de la estructura y función del ribosoma”. (Química)
2010	ROBERT G. EDWARDS : “por el desarrollo de la fecundación in vitro”

2011	<p>BRUCE A. BEUTLER y JULES A. HOFFMANN: “Por sus descubrimientos en relación con la activación de la inmunidad innata”</p> <p>RALPH M. STEINMAN: “Por su descubrimiento de la célula dendrítica y su papel en la inmunidad adaptativa”</p>
2012	JOHN B. GURDON y SHINYA YAMANAKA: “Por el descubrimiento de que las células maduras [diferenciadas] pueden ser reprogramadas para llegar a ser pluripotentes”
2013	JAMES E. ROTHMAN, RANDY W. SCHEKMAN y THOMAS C. SÜDHOF: “Por sus descubrimientos de la maquinaria que regula el tráfico de vesículas, un sistema de transporte principal en nuestras células”
2015	TOMAS LINDAHL, PAUL MODRICH y AZIZ SANCAR: “Por sus estudios de los mecanismos de reparación del ADN”
2016	YOSHINORI OHSUMI: “por sus descubrimientos de los mecanismos para la autofagia”

CUADRO 1.2

CUADRO 1.2 (volver página anterior)

CIENTÍFICOS GALARDONADOS CON EL PREMIO NOBEL POR SU TRABAJO EN EL CAMPO DE LA GENÉTICA O TEMAS AFINES	
Sidney ALTMAN (*1939)	Química, 1989
Werner ARBER (*1929)	Fisiología o Medicina, 1978
Richard AXEL (*1946)	Fisiología o Medicina, 2004
David BALTIMORE (*1938)	Fisiología o Medicina, 1975
Françoise BARRÉ-SINOUSI (*1947)	Fisiología o Medicina, 2008
George W. BEADLE (*1903 - †1989)	Fisiología o Medicina, 1958
Baruj BENACERRAF (*1920)	Fisiología o Medicina, 1980
Paul BERG (*1926)	Química, 1980
Bruce A. BEUTLER (*1957)	Fisiología o Medicina, 2011
J. Michael BISHOP (*1936)	Fisiología o Medicina, 1989
Elizabeth H. BLACKBURN (*1948)	Fisiología o Medicina, 2009
Norman E. BORLAUG (*1914)	Paz, 1970
Sydney BRENNER (*1927)	Fisiología o Medicina, 2002
Linda B. BUCK (*1947)	Fisiología o Medicina, 2004
Frank Macfarlane BURNET (*1899 - †1985)	Fisiología o Medicina, 1960
Mario R. CAPECCHI (* 1937)	Fisiología o Medicina, 2007
Thomas R. CECH (*1947)	Química, 1989
Martin CHALFIE (*1947)	Química, 2008
Francis H. C. CRICK (*1916-†2004)	Fisiología o Medicina, 1962
Jean DAUSSET (*1916)	Fisiología o Medicina, 1980
Max DELBRÜCK (*1906 - †1981)	Fisiología o Medicina, 1969
Peter C. DOHERTY (*1940)	Fisiología o Medicina, 1996
Renato DULBECCO (*1914 - †2012)	Fisiología o Medicina, 1975

Gerald M. EDELMAN (*1929 - †2014)	Química, 1972
Robert G. EDWARDS (*1925 - †2013)	Fisiología o Medicina, 2010
Martin J. EVANS (* 1941)	Fisiología o Medicina, 2007
Andrew Z. FIRE (*1959)	Fisiología o Medicina, 2006
Karl R. Von Frisch (*1886 - †1982)	Fisiología o Medicina, 1973
Walter GILBERT (*1932)	Química, 1980
Carol W. GREIDER (*1961)	Fisiología o Medicina, 2009
John B. GURDON (*1933)	Fisiología o Medicina, 2012
Leland H. HARTWELL (*1939)	Fisiología o Medicina, 2001
Harald zur HAUSEN (*1936)	Fisiología o Medicina, 2008
Alfred D. HERSHEY (*1908)	Fisiología o Medicina, 1969
Jules A. HOFFMANN (*1941)	Fisiología o Medicina, 2011
Robert W. HOLLEY (*1922 - †1993)	Fisiología o Medicina, 1968
H. Robert HORVITZ (*1947)	Fisiología o Medicina, 2002
R. Timothy HUNT (* 1943)	Fisiología o Medicina, 2001
Francois JACOB (*1920-†2013)	Fisiología o Medicina, 1965
Niels K. JERNE (*1911)	Fisiología o Medicina, 1984
Har Gobind KHORANA (*1922)	Fisiología o Medicina, 1968
Aaron KLUG (*1926)	Química, 1982
George J. F. KÖHLER (*1946 - †1995)	Fisiología o Medicina, 1984
Arthur KORNBERG (*1918-†2007)	Fisiología o Medicina, 1959
Roger D. KORNBERG (* 1947)	Química, 2006
Albrecht KOSSEL (*1853 - †1927)	Fisiología o Medicina, 1910
Karl LANDSTEINER (*1868 - †1943)	Fisiología o Medicina, 1930
Joshua LEDERBERG (*1925)	Fisiología o Medicina, 1958
Edward B. LEWIS (*1918 - †2004)	Fisiología o Medicina, 1995
Tomas LINDAHL (*1936)	Química, 2015
Karl Lorenz (*1903 - †1989)	Fisiología o Medicina, 1973
Salvador E. LURIA (*1912 - †1991)	Fisiología o Medicina, 1969

André LWOFF (*1902 -†1994)	Fisiología o Medicina, 1965
Barbara McCLINTOCK (*1902 -†1992)	Fisiología o Medicina, 1983
Peter B. MEDAWAR (*1915 -†1987)	Fisiología o Medicina, 1960
Craig C. MELLO (*1960)	Fisiología o Medicina, 2006
César MILSTEIN (*1927)	Fisiología o Medicina, 1984
Paul MODRICH (*1946)	Química, 2015
Jacques MONOD (*1910 -†1976)	Fisiología o Medicina, 1965
Luc MONTAGNIER (*1932)	Fisiología o Medicina, 2008
Thomas H. MORGAN (*1866 -†1945)	Fisiología o Medicina, 1933
Hermann J. MULLER (*1890 -†1967)	Fisiología o Medicina, 1946
Kary B. MULLIS (*1944)	Química, 1993
Daniel NATHANS (*1928)	Fisiología o Medicina, 1978
Marshall W. NIRENBERG (*1927-†2010)	Fisiología o Medicina, 1968
Paul M. NURSE (*1949)	Fisiología o Medicina, 2001
Christiane NÜSSLEIN-VOLHARD (*1942)	Fisiología o Medicina, 1995
Severo OCHOA (*1905 -†1993)	Fisiología o Medicina, 1959
Yoshinori OHSUMI (*1945)	Fisiología o Medicina, 2016
Rodney R. PORTER (*1917 -†1985)	Química, 1972
Venkatraman RAMAKRISHNAN (*1952)	Química, 2009
Richard J. ROBERTS (*1943)	Fisiología o Medicina, 1993
Aziz SANCAR (*1946)	Química, 2015
Frederick SANGER (*1918-†2013)	Química, 1980
Randy W. SCHECKMAN (*1948)	Fisiología o Medicina, 2013
Phillip A. SHARP (*1943)	Fisiología o Medicina, 1993
Osamu SHIMOMURA (*1928)	Química, 2008
Hamilton O. SMITH (*1931)	Fisiología o Medicina, 1978
Michael SMITH (*1932)	Química, 1993
Oliver SMITHIES (* 1925)	Fisiología o Medicina, 2007
George SNELL (*1903)	Fisiología o Medicina, 1980

RalpH M. STEINMAN (*1943-†2011)	Fisiología o Medicina, 2011
Thomas A. STEITZ (*1940)	Química, 2009
John E. SULSTON (*1942)	Fisiología o Medicina, 2002
Jack W. SZOSTAK (*1952)	Fisiología o Medicina, 2009
Edward L. TATUM (*1909 -†1975)	Fisiología o Medicina, 1958
Howard M. TEMIN (*1934 -†1994)	Fisiología o Medicina, 1975
Nikolaas Tinbergen (*1907 -†1988)	Fisiología o Medicina, 1973
Alexander R TODD ((*1907 -†1997)	Química, 1957
Susumu TONEGAWA (*1939)	Fisiología o Medicina, 1987
Roger Y. TSIEN (*1952-†2016)	Química, 2008
Harold E. VARMUS (*1939)	Fisiología o Medicina, 1989
James D. WATSON (*1928)	Fisiología o Medicina, 1962
Eric F. WIESCHAUS (*1947)	Fisiología o Medicina, 1995
Maurice H. F. WILKINS (*1916 -†2004)	Fisiología o Medicina, 1962
Shinya YAMANAKA (*1962)	Fisiología o Medicina, 2012
Ada E. YONATH (*1939)	Química, 2009
Rolf M. ZINKERNAGEL (*1944)	Fisiología o Medicina, 1996

CUADRO 1.3

CUADRO 1.3 (volver página anterior)

DISCURSOS DE RECEPCIÓN DE LOS PREMIOS NOBEL (NOBEL LECTURES)

ALTMAN, S.- “Enzymatic cleavage of RNA by RNA”

ARBER, W.- “Promotion and limitation of genetic exchange”

AXEL, R.- “Scents and sensibility: A molecular logic of olfactory perception”

BALTIMORE, D.- “Viruses, polymerases, and cancer”

BARRÉ-SINOUSSE, F.- “HIV: a discovery opening the road to novel scientific achievements and global health improvement”

BEADLE, G.W.- “Genes and chemical reactions in *Neurospora*”

BENACERRAF, B.- “The role of MHC gene products in immune regulation and its relevance to alloreactivity”

BERG, P.- “Dissections and reconstructions of genes and chromosomes”

BEUTLER, B.A.- “How mammals sense infection: from endotoxin to the Toll-like receptors”

BISHOP, J.M.- “Retroviruses and oncogenes II”

BORLAUG, N.E.- “The green revolution, peace, and humanity”

BLACKBURN, E.H.- “Telomeres and telomerase: The means to the end”

BRENNER, S.- “Nature’s gift to Science”

BUCK, L.B.- “Unravelling the sense of smell”

BURNET, F.M.- “Immunological recognition of self”

CAPECCHI, M.R.- “Gene targeting in the 21st Century: Mouse models of human disease from cancer to psychiatric disorders”

CECH, T.R.- “Self-splicing and enzymatic activity of an intervening sequence RNA from *Tetrahymena*”

CHALFIE, M.- “GFP: Lighting up life”

CRICK, F.H.C.- “On the genetic code”

DAUSSET, J.- “Concepts passés, présents et futurs sur le complexe majeur d’histocompatibilité de l’homme (HLA)”

DELBRÜCK, M.- “A physicist’s renewed look at biology – Twenty years later”

DOHERTY, "Cell mediated immunity in virus infection"

DULBECCO, R.- "From the molecular biology of oncogenic DNA viruses to cancer"

EDELMAN, G.M.- "Antibody structure and molecular immunology"

EDWARDS, R.G.- "Bob Edwards and IVF: The early days" (simposio en honor del Dr. Edwards , ausente por razones de salud, presentado por Martin H. Johnson)

EVANS, M.J.- "ES cells: The mouse source – vehicle for mammalian experimental genetics"

FIRE, A.Z.- "Gene silencing by double-stranded RNA"

von FRISCH, K.- "Decoding the language of the bee"

GILBERT, W.- "DNA sequences and gene structure"

GREIDER, C.W.- "Telomerase and the consequences of telomere dysfunction"

GURDON, J.B.- "The egg and the nucleus: a battle for supremacy"

HARTWELL, L.H.- "Yeast and cancer"

zur HAUSEN, H.- "The search for infectious causes of human cancers: Where and why?"

HERSHEY, A.D.- "Idiosyncrasies of DNA structure"

HOFFMANN, J.A.- "Evolutionary perspectives of innate immunity: studies with Drosophila"

HOLLEY, R.W.- "Alanine transfer RNA"

HORVITZ, H. Robert. - "Worms, life and death"

HUNT, R.T.- "Protein synthesis, proteolysis, and the cell cycle transitions"

JACOB, F.- "Genétique de la cellule bacterienne"

JERNE, N.K.- "The generative grammar of the immune system"

KHORANA, H.G.- "Nucleic acid synthesis in the study of the genetic code"

KLUG, A.- "From macromolecules to biological assemblies"

KÖHLER, G.J.F.- "Derivation and diversification of monoclonal antibodies"

KORNBERG, A.- "The biologic synthesis of desoxyribonucleic acid"

KORNBERG, R.D.- "The molecular basis of eukaryotic transcription"

KOSSEL, A.- "Über die chemische beschaffenheit des zellkerns"

LANDSTEINER, K.- "Über individuelle unterschiede des menschlichen blutes"

LEDERBERG, J.- "A view of Genetics"

LEWIS, E.B.- "The bithorax complex. The first fifty years"

LINDAHL, T.- "The intrinsic fragility of DNA"

LORENZ, K.- "Analogy as a source of knowledge"

LURIA, S.E.- "Phage, colicins, and macroregulatory phenomena"

LWOFF, A.- "Interactions entre virus, cellule et organism"

McCLINTOCK, B.- "The significance of responses of the genome to challenge"

MEDAVAR, P.B.- "Immunological tolerance"

MELLO, C.C.- "RNAi and development in *C. Elegans*"

MILSTEIN, C.- "From the structure of antibodies to the diversification of the immune response"

MODRICH, P.- "Mechanisms in *E. coli* and human mismatch repair"

MONOD, J.- "De l'adaptation enzymatique aux transitions allostériques"

MONTAGNIER, L.- "25 years of research on AIDS – Lessons and prospects for cure and vaccine"

MORGAN, T.H.- "The relation of Genetics to Physiology and Medicine"

MULLER, H.J.- "The production of mutations"

MULLIS, K.B.- "The polymerase chain reaction"

NATHANS, D.- "Restriction endonucleases, simian virus 40, and the new genetics"

NIRENBERG, M.W.- "The genetic code"

NURSE, P.M.- "Controlling the cell cycle"

NÜSSLEIN-VOLHARD, C.- "The identification of genes controlling development in flies and fishes"

OCHOA, S.- "Enzymatic synthesis of ribonucleic acid"

OHSUMI, Y.- "Autophagy- an intracellular recycling system"

PORTER, R.R.- "Structural studies of immunoglobulins"

RAMAKRISHNA, V.- "Decoding the genetic message: The 3D version"

ROBERTS, R.J.- "An amazing distortion in DNA induced by a methyltransferase"

SANCAR, A.- "Mechanisms of DNA repair by photolyase and excision nuclease"

SANGER, F.- "Determination of nucleotide sequences in DNA"

SCHEKMAN, R.W.- "Genes and proteins that organize the secretory pathway"

SHARP, P.A.- "Split genes and RNA splicing"

SHIMOMURA, O.- "Discovery of green fluorescent protein, GFP"

SMITH, H.O.- "Nucleotide sequence specificity of restriction endonucleases"

SMITH, M.- "Synthetic DNA and Biology"

SMITHIES, O.- "Turning pages"

SNELL, G.D.- "Studies in histocompatibility"

STEINMAN, R.M.- "In memory of Ralph M. Steinman", por Michel C. Nussenzweig (Fallecido antes de recibir el premio)

STEITZ, T.A.- "From understanding ribosome structure and function to new antibiotics"

SULSTON, John E.- "*C. elegans*: the cell lineage and beyond"

SZOSTAK, J.W.- "DNA ends: Just the beginning"

TATUM, E.L.- "A case history in biological research"

TEMIN, H.M.- "The DNA provirus hypothesis"

TINBERGEN, N.- "Ethology and stress diseases"

TODD, A.R.- "Synthesis in the study of nucleotides"

TONEGAWA, S.- "Somatic generation of immune diversity"

TSIEN, R.Y.- "Constructing and exploiting the fluorescent protein paintbox"

VARMUS, H.E.- "Retroviruses and oncogenes I"

WATSON, J.D.- "The involvement of RNA in the synthesis of proteins"

WIESCHAUS, E.F.- "Molecular patterns to morphogenesis. The lessons from *Drosophila*"

WILKINS, M.H.F.- "The molecular configuration of nucleic acids"

YAMANAKA, S.- "A winding road to pluripotency"

YONATH, A.E.- "Polar bears, unpaved roads, Everest climbing and ribosomes in action"

ZINKERNAGEL, R.M.- "The cellular immune recognition and the biological role of major transplantation antigens"

CUADRO 4.1

[Volver al capítulo 3.2](#)

[Volver al capítulo 4](#)

REGLA DE ORO DE LA INVESTIGACIÓN Y LOS PREMIOS NOBEL

▪ **Pregunta importante: los genes**

- ¿Qué son?
- ¿Cómo se organizan y transmiten?
- ¿Cómo y cuándo se expresan?
- ¿Cómo cambian?
- ¿Cuál es su destino en el espacio y en el tiempo?

(ver cuadros anteriores)

▪ **Material biológico**

- Guisante (1865): Mendel
- *Drosophila* (1910): Morgan (1933); Muller (1946); Lewis, Nüsslein-Volhard y Wieschaus (1995); Hoffmann (2011)
- Hongos: *Neurospora* (1941) (Beadle y Tatum, 1958); levaduras, *Saccharomyces* y *Schizosaccharomyces* (1974, 2001) (Hartwell, Nurse, 2001; Kornberg, R.D., 2006), (Blackburn, Greider y Szostak, 2009) (Schekman, 2013), autofagia 1980sibili (Ohsumi, 2016)
- Virus: fagos (1943, 1946) Delbrück, Luria, Hershey (1969); retrovirus (1964) (Baltimore, Dulbecco, Temin, 1975), papiloma humano (1974) (zur Hausen, 2008), retrovirus VIH (1983): Barré-Sinoussi y Montagnier (2008)
- Bacterias: Conjugación (1946) (Lederberg, 1958); Lisogenia (1950) (Lwoff, 1965); síntesis ADN (1956) (Kornberg, A., 1959); traducción: análisis atómico de la estructura y función del ribosoma (Ramakrishna, Steitz, Yonah, 2009); Reparación del ADN (Lindahl, Modrich y Sancar, 2015)
- Protistas ciliados, *Tetrahymena*: Blackburn (2009)
- Ratón: Baltimore (1975), Snell y Benacerraf (1980), Köhler y Milstein (1984), Tonegawa (1987), Doherty y Zinkernagel (1996), Axel y Buck (2004), Capecchi, Evans y Smithies (2007), Beutler y Steinman (2011), Yamanaka (2012)
- Anfibios (*Xenopus laevis*), Gurdon (2012)

- Nematodos, *Caenorhabditis elegans* (1974, 1994, 1998): Brenner, Horvitz y Sulston (2002), Fire y Mello (2006), Chalfie (2008)
- Humano : Landsteiner (1930), Dausset (1980), Yamanaka (2012)
- Trigo: Borlaug (1970)
- Maíz (1951): McClintock (1983)

▪ Técnica

- Tecnología de ácidos nucleicos
 - Endonucleasas de restricción (1973): Arber, Smith y Nathans (1978)
 - Secuenciación del ADN (1975, 1977): Gilbert y Sanger (1980)
 - Moléculas de ADN recombinante (1972): Berg (1980)
 - Reacción en cadena de la polimerasa, PCR (1985): Mullis (1993)
 - Mutagénesis dirigida (1979): Smith (1993)
 - Tecnología *knock-out* (1981, 1986, 1987): Capecchi, Evans y Smithies (2007)
 - Proteína fluorescente verde, GFP (1962, 1994): Shimomura, Chalfie y Tsien (2008)
- Técnicas de apoyo
 - Anticuerpos monoclonales (1975): Köhler y Milstein (1984)
 - Fecundación in vitro (1970): Edwards (2010)
 - Ultracentrífuga: Svedberg (1926)
 - Electroforesis: Tiselius (1948)
 - Microscopio electrónico: Ruska (1986)
 - Microscopio electrónico de barrido: Binning y Rohrer (1986)
 - Microscopio de fluorescencia (Nanoscopía): Berzig, Hell y Moerner (2014)

(Las fechas indicadas en primer lugar corresponden a las de publicación de los trabajos originales fundamentales mientras que las que aparecen detrás de los nombres hacen referencia a las de concesión del premio Nobel correspondiente).

PUBLICACIONES



**Real Academia
Nacional de Farmacia**